

**Charakterisierung der essentiellen Eisen-Schwefel-Cluster
Biosynthesekomponenten des Suf-Systems in *Bacillus subtilis***

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**Dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität-Marburg**

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Alexander Gerhard Albrecht

aus Rotenburg an der Fulda

Marburg an der Lahn 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel von Dezember 2007 bis Januar 2011 an der Philipps-Universität-Marburg durchgeführt.

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität-Marburg (Hochschulkennziffer: 1180) als Dissertation
am _____._____._____angenommen.

Erstgutachter: Herr Prof. Mohamed A. Marahiel
Zweitgutachter: Herr Prof. Roland Lill

Datum der Mündlichen Prüfung:

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde in folgenden Artikeln publiziert

Albrecht AG, Netz DJ, Miethke M, Pierik AJ, Burghaus O, Peuckert F, Lill R, Marahiel MA., SufU is an essential iron-sulfur cluster scaffold protein in *Bacillus subtilis*. *J. Bact.*, **2010**(192), 1643-1651

Albrecht AG, Peuckert F, Landmann H, Miethke M, Seubert A, Marahiel MA., Mechanistic characterization of sulfur transfer from cysteine desulfurase SufS to the iron-sulfur scaffold SufU in *Bacillus subtilis*., *FEBS Letters*, **2011**(585), 465-470

Albrecht AG, Landmann H, Nette D, Burghaus O, Peuckert F, Seubert A, Miethke M, Marahiel MA, The Frataxin Homologue Fra Plays a Key Role in Intracellular Iron Channeling in *Bacillus subtilis*, *ChemBioChem*, **2011**(12), 2052-2061

Im Verlauf der Promotion wurden weiterhin folgende Artikel veröffentlicht

Peuckert F, Miethke M, **Albrecht AG**, Essen LO, Marahiel MA., Structural basis and stereochemistry of triscatecholate siderophore binding by FeuA., *Angewandte Chemie Int. Ed. Engl.*, **2009**(48), 7924-7927

Bugdahn N, Peuckert F, **Albrecht AG**, Miethke M, Marahiel MA, Oberthür M., Direct identification of a siderophore import protein using synthetic petrobactin ligands. , *Angewandte Chemie Int. Ed. Engl.*, **2010**(49), 10210-10213

Peuckert F, Ramos-Vega AL, Miethke M, Schwörer CJ, **Albrecht AG**, Oberthür M, Marahiel MA, The siderophore binding protein FeuA shows limited promiscuity toward exogenous triscatecholates, *Chem Biol.*, **2011**(18), 907-919.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „**Charakterisierung der essentiellen Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesekomponenten des Suf-Systems in *Bacillus subtilis***“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum) (Unterschrift)

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Eisen-Schwefel-Cluster gehören zu den wichtigsten und vielseitigsten Cofaktoren in der Natur. Viele essentielle Stoffwechselwege, wie der Citratzyklus oder die Atmungskette sind direkt abhängig von Eisen-Schwefel-Enzymen. Durch die Toxizität von freiem Eisen und Sulfid sind die Organismen auf eine streng regulierte Biosynthese der Fe/S-Cluster angewiesen. Hierfür haben sich verschiedene Maschinerien entwickelt, die in allen Fällen auf drei essentiellen Kernkomponenten aufbauen: Einem Scaffoldprotein, auf dem der Cluster assembliert wird, eine Cysteindesulfurase zur Mobilisierung von Schwefel aus Cystein und ein Eisendonator, vermutlich ein Homologes von Frataxin.

In dieser Arbeit wurden die Kernkomponenten des Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthesesystems von *Bacillus subtilis* untersucht. Nach der Identifizierung des potentiellen SufCDSUB-Systems durch BLAST-Analyse, wurde durch *in vivo* Untersuchungen an Deletionsmutanten zunächst das putative Scaffoldprotein SufU identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Expression von SufU drastische Auswirkungen auf das Wachstum sowie eine reduzierte Aktivität von Eisen-Schwefel-Proteinen in *Bacillus subtilis* zur Folge hat. Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass SufU in der Lage ist, einen Fe/S-Cluster zu binden und diesen auf *apo*-Fe/S-Proteine zu transferieren.

Neben dem Scaffoldprotein wurde die zweite Kernkomponente der Fe/S-Cluster Biosynthese charakterisiert: die Cysteindesulfurase SufS. Hier konnte gezeigt werden, dass SufS nur sehr geringe Aktivität aufweist und erst durch das Scaffoldprotein SufU aktiviert wird. Die Aktivierung von SufS ist dabei sowohl von der Cystein- als auch von der SufU-Konzentration abhängig. Durch weitere kinetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Sulfidtransfer zwischen SufS und SufU einem Ping-Pong Reaktionsmechanismus folgt und Cystein 41 in SufU für den Mechanismus des Sulfidtransfers eine entscheidende Rolle spielt.

Abschließend wurde Fra (YdhG) charakterisiert; ein Protein, das stukturhomolog zu humanem Frataxin ist. Eine Fra-Deletionsmutante zeigte einen Phänotyp, der auf eine deutliche Störung des gesamten Eisenhaushalts hindeutet. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Fra in der Lage ist Eisen zu binden und als Eisendonator für den Fe/S-Cluster Aufbau von SufU zu wirken.

Summary

Iron-Sulfur-Clusters are some of the most important and versatile cofactors in nature. Many essential metabolic pathways, like the respiratory chain or the citrate cycle are directly dependent on iron-sulfur-cluster containing enzymes. However the toxicity of free iron and sulfide required the development of biosynthetic pathways that minimize the concentrations of free iron or sulfide. This led to the development of evolutionary highly conserved biosynthetic machineries for the construction of iron sulfur-clusters that build upon three essential core components: A scaffold-protein on which the cluster is assembled, a cysteine desulfurase, which catalyzes sulfur mobilization and an iron donating protein, most likely a frataxin homolog.

In this study the core components of the *Bacillus subtilis* iron sulfur-cluster biosynthesis system were characterized. After the identification of the putative biosynthesis system via BLAST analysis, the function of the SufU scaffold protein was identified using deletion mutants. SufU was then further characterized by *in vitro* studies. We could show that reduced expression of SufU led to a severe growth phenotype of *Bacillus subtilis* and a reduced activity of iron sulfur proteins. Further it could be shown that recombinant SufU was able to bind an Fe/S-cluster and transfer this cluster to *apo*-Fe/S-proteins.

In addition to the scaffold protein the second core component of the biosynthesis system was characterized: the cysteine desulfurase SufS. It could be shown that purified SufS is inactive and needs to be activated by *apo*-SufU. The activity is dependent on both the cysteine and SufU concentration and the reaction follows a ping-pong-reaction mechanism as shown by kinetic studies. Furthermore it was found that cysteine 41 of SufU plays an important role in the sulfur transfer mechanism between SufS and SufU.

In the last part of this work the putative iron-binding protein Fra (YdhG) was characterized, which is a structural homolog of human frataxin. The deletion of the gene encoding Fra in *B. subtilis* led to a severe growth Phenotype and reduced activity of iron sulfur proteins, indicating a greater disturbance of the iron homeostasis. *In vitro* studies showed that Fra was able to bind iron and acts as an iron donating protein during iron sulfur cluster assembly on SufU.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC	ATP-Bindungskassette (ATP-Binding cassette)
Aco	Aconitase
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATC	A-Typ Transporter (A-type carrier)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>bd.</i>	bidestilliert
BLAST	basic local alignment search tool
BOC	Belitsky ohne Citrat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
c	Konzentration (concentration)
CAS	chrome-azurol S
CD	Circulardichroismus
Da	Dalton
DCPIP	Dichlorophenol-Indophenol
DHB	Dihydroxybenzoat
DMPD	N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin
DMPO	5,5-dimethyl-pyrroline N-oxide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxiribonucleic acid)
dNTPs	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
EPR	Elektronen Spin Resonanz (electron paramagnetism resonance)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
FAC	Ammonium-Eisen(III)-Citrat (ferric ammonium citrate)
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FPLC	fast performance liquid chromatography
HEPES	2-N'-[N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography

ICP	inductively coupled plasma
IDH	Isocitratdehydrogenase
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
MCS	multiple cloning site
MDH	Malatdehydrogenase
MeOH	Methanol
MM	Minimalmedium
MS	Massenspektrometrie (mass spectrometry)
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NAD/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP/NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NMR	nuklear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriacetat
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDB	Protein Datenbank
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
QTOF	quadrupol time of flight
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species)
RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen / Minute
RT	Raumtemperatur
SAXS	small angle X-ray scattering
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Sodiumdodecylsulphate
SDS PAGE	sodiumdodecylsulphate poly-acrylamide gel electrophoresis
SEC	Size exclusion chromatography
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit (reaction velocity)
v/v	volume/volume

VIS	sichtbar (visible)
w/v	weight / volume
WT	Wildtyp
Xyl	Xylose

Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	MW/Da
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Asparaginsäure	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Gln	Q	146
Glutaminsäure	Glu	E	147
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IX
Summary	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
Inhaltsverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Eisen-Schwefel-Cluster	2
1.2 Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern	5
1.2.1 Gemeinsame Komponenten aller Systeme	5
1.2.2 Das Nif-System	8
1.2.3 Das ISC-System	9
1.2.4 Das Suf-System	16
1.2.5 A-Typ – Transporter (A-type carrier)	23
1.2.6 Varianten der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesesysteme	24
1.3 Frataxin und Homologe	26
1.3.1 Eukaryotisches Frataxin und Friedreich Ataxie	26
1.3.2 Das bakterielle Frataxin-Homologe - CyaY	28
1.3.3 Das potentielle Frataxin-Homologe YdhG	32
1.4 Aufgabenstellung	33
2 Material	35
2.1 Geräte	35
2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	37
2.3 Oligonucleotide	38
2.4 Vektoren	40
2.4.1 pET28a(+)-Vektor	40
2.4.2 pTrcHis-TOPO und pTrcHis2-TOPO	41
2.4.3 pX-Vektor	42

2.4.4	pMUTIN und pDG780	43
2.5	Mikroorganismen.....	43
2.5.1	<i>Bacillus subtilis</i> MR 168	43
2.5.2	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332.....	43
2.5.3	<i>Bacillus subtilis</i> Mutanten.....	43
2.5.4	<i>Escherichia coli</i> TOP10	44
2.5.5	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	44
2.6	Kulturmedien.....	44
2.6.1	LB-Medium.....	44
2.6.2	DSM-Medium	45
2.6.3	Belitsky Minimalmedium.....	45
2.6.4	<i>Bacillus subtilis</i> Kompetenzmedium.....	46
3	Methoden.....	49
3.1	Arbeit unter anaeroben Bedingungen	49
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	49
3.2.1	Anzucht von <i>Bacillus subtilis</i>	49
3.2.2	Präparation chromosomaler DNA	49
3.2.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	50
3.2.4	Konstruktion der Expressionsplasmide.....	50
3.2.5	Ortsgerichtete Mutagenese	52
3.2.6	Erzeugung von <i>Bacillus subtilis</i> Mutanten.....	53
3.2.7	CAS und 2,2'-Bipyridyl Experimente	53
3.3	Proteinchemische Methoden.....	54
3.3.1	Genexpression	54
3.3.2	Zellaufschluss.....	54
3.3.3	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	55
3.3.4	Gelfiltrationschromatographie	55

3.3.5	Native 2D-Proteomanalyse	56
3.4	Analytische Methoden	56
3.4.1	Chemische Eisen-Bestimmung mit Feren	56
3.4.2	Chemische Sulfidbestimmung.....	57
3.4.3	Peptidmassen-Fingerabdruck	58
3.4.4	ICP/MS	58
3.4.5	HPLC-MS.....	58
3.4.6	In-Gel Proteinquantifizierung	59
3.5	Spektroskopische Methoden.....	59
3.5.1	UV/VIS-Spektroskopie	59
3.5.2	CD-Spektroskopie	59
3.5.3	EPR-Spektroskopie	60
3.6	Biochemische Methoden	60
3.6.1	Eisen-Schwefel-Cluster Rekonstitution	60
3.6.2	Eisenbeladung von YdhG.....	61
3.6.3	Cysteindesulfuraseassays	61
3.6.4	Clustertransfer-Assays	61
3.6.5	Aconitase-Aktivitätsassay	62
3.6.6	Succinat-Dehydrogenase Aktivitätsassay	63
3.6.7	Malat-Dehydrogenase Aktivitätsassay.....	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Identifizierung und Charakterisierung des Scaffoldproteins	65
4.1.1	Bioinformatische Identifizierung des potentiellen Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthesystems.....	65
4.1.2	Untersuchung der physiologischen Relevanz der putativen Scaffoldproteine...	67
4.1.3	Charakterisierung von SufU	71
4.2	Charakterisierung der Cysteindesulfurase SufS	81
4.2.1	Klonierung und Expression von SufS	81

4.2.2	Kinetische Charakterisierung von SufS	82
4.2.3	Einfluss von EDTA auf die Cysteindesulfuraseaktivität.....	85
4.2.4	Eisen-Schwefel-Cluster-Rekonstitution auf SufU durch SufS.....	85
4.3	Interaktion von SufU und SufS	86
4.3.1	Kinetische Untersuchungen der Interaktion zwischen SufS und SufU.....	86
4.3.2	Physikalische Interaktion zwischen SufS und SufU	88
4.4	Untersuchung und Charakterisierung des potentiellen Frataxin-Homologen YdhG. 90	
4.4.1	Identifizierung von YdhG über native Proteom-Analyse.....	91
4.4.2	<i>In vitro</i> Analyse von YdhG	93
4.4.3	<i>In vivo</i> Analyse von YdhG	97
5	Diskussion	105
5.1	Initiale Identifizierung des Suf-Systems und YdhG.....	105
5.2	Charakterisierung der Kernkomponenten der Fe/S-cluster Biosynthese.....	110
5.2.1	Analyse der potentiellen Scaffoldproteine SufU und YutM	110
5.2.2	Die Cysteindesulfurase SufS	116
5.2.3	Das Frataxinhomologe YdhG.....	123
5.3	Die Eisenhomöostase von <i>Bacillus subtilis</i>	127
5.4	Ausblick.....	128
6	Literatur	131
7	Danksagung.....	141
	Wissenschaftlicher Werdegang des Verfassers.....	143

1 Einleitung

Eisen ist das vierthäufigste Element der Erdkruste (4.7 % Massenanteil) und das zweithäufigste Element bezogen auf die Gesamtmasse der Erde (28.8 % Massenanteil) [1]. Im Meerwasser ist es hingegen nur zu 0.002 mg/L enthalten. Lange Zeit war Eisen(II) die vorherrschende Form des Eisens. Mit Beginn der Photosynthese und dem Aufkommen elementaren Sauerstoffs wandelte sich die vorherrschende Form zu Eisen(III), welches im Gegensatz zu Eisen(II) eine viel geringere Löslichkeit besitzt (Eisen(II): 0.1 mol/L; Eisen(III): 10^{-9} - 10^{-18} mol/L) [2, 3].

Aufgrund der hohen Löslichkeit von Eisen(II) und da Eisen(II) relativ leicht in Eisen(III) und zurückumgewandelt werden kann (Redoxpotential: -0.44 eV), hatte sich Eisen als wichtiger Cofaktor etabliert [1]. Das Redoxpotential von Eisen ist jedoch von vielen Faktoren wie dem pH-Wert und seiner chemischen Umgebung abhängig. Seine Koordinationschemie erlaubt verschiedene Koordinationssphären und Spinzustände, wodurch es ein idealer Kandidat für biologische Katalysen ist. Das Problem der geringen Löslichkeit überwinden Mikroorganismen durch Siderophore. Dabei handelt es sich um Eisenchelatoren, die eine extrem hohe Affinität zu Eisen(III) besitzen ($10^{22} - 10^{49}$ mol/L) [4]. Die Aufnahme von Eisen aus der Umgebung und der intrazelluläre Transport muss jedoch streng reguliert werden, da freies Eisen besonders unter aeroben Bedingungen toxisch für Zellen ist durch das Freisetzen von ROS (reaktive Sauerstoffspezies, engl. *reactive oxygen species*) nach der Fenton-Reaktion toxisch für Zellen ist:



Daher muss die Konzentration an freiem Eisen in den Zellen minimiert werden und eine geordnete Regulierung des Eisenhaushaltes erfolgen.

Trotz dieser Schwierigkeiten hat sich Eisen zu einem der wichtigsten Cofaktoren von Proteinen entwickelt, z.B. in Form von Häm-Gruppen oder als Seitenketten gebundenes Ion. Viele wichtige Stoffwechselprozesse, wie zum Beispiel die Atmungskette oder der Citratzyklus werden von Eisen-abhängigen Enzymen beherrscht, in den häufig Eisen-Schwefel-Cluster als Cofaktoren zu finden sind.

1.1 Eisen-Schwefel-Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster sind polynukleare Kombinationen aus Eisen- und Schwefel-Atomen, die in einem Protein gebunden sind. Sie gehören zu den strukturell und funktionell vielfältigsten Cofaktoren in Zellen [5-7]. Sie wurden in den 1960er Jahren als katalytische Zentren der Elektronentransportketten innerhalb der Photosynthese oder der Atmungskette identifiziert [7, 8]. Im Laufe der Zeit wurden weitere Proteine gefunden, die Eisen-Schwefel-Cluster als funktionelle Gruppe nutzen, darunter auch viele, die sie nicht nur zum Elektronentransport nutzen. Dies macht sie zu den vielfältigsten biologischen Cofaktoren.

Die wichtigsten und häufigsten Vertreter von Eisen-Schwefel-Clustern sind: [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- und [4Fe-4S]-Cluster (Abb. 1.1).

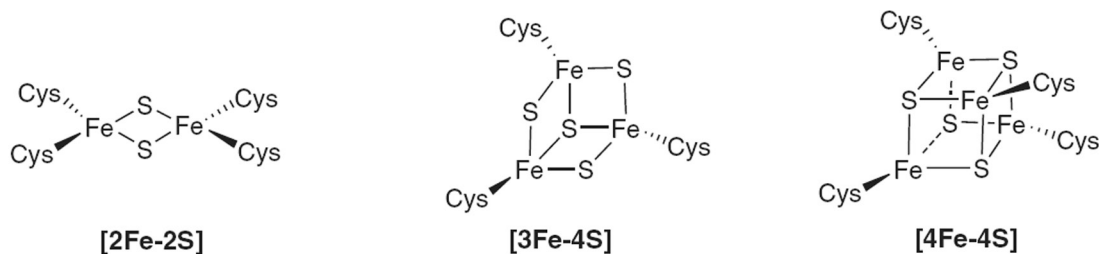


Abbildung 1.1 Die wichtigsten Formen von Fe/S-Clustern [7].

Die Funktionen der Cluster sind so vielfältig wie die Clustertypen selbst. Während [2Fe-2S]- und [3Fe-4S]-Cluster im Wesentlichen für Elektronentransferreaktionen genutzt werden, sind [4Fe-4S]-Cluster aufgrund ihrer Vielzahl an möglichen Redox-Zuständen weitaus flexibler und diversifizierter was ihre Funktionen betrifft [5-7]. Sie sind ideale Kandidaten für Redoxreaktionen, da sich ihr Redoxpotential durch viele verschiedene Faktoren, wie die Proteinumgebung oder pH-Wert, stark verändert. So kann das Redoxpotential eines [4Fe-4S]-Clusters je nach Reaktionsbedingungen von 500 mV bis unter -500 mV eingestellt werden [7].

Die Eisen-Schwefel-Cluster werden dabei in der Regel von Cysteinen innerhalb des Proteins gebunden, aber es gibt auch einige Beispiele, wo die Cluster durch Stickstoff- oder Sauerstoffliganden, wie z.B. Histidin, Arginin, Glutamat oder Tyrosin gebunden werden [7]. Teilweise ist auch eine Koordination durch externe Liganden wie DTT möglich [7, 9].

Proteine sind dabei nicht auf einen Cluster pro Protein beschränkt, sondern können mehrere Cluster besitzen, um durch diese Elektronen zu transportieren; wie zum Beispiel innerhalb des Komplex I der Atmungskette, die NADH:ubiquinon Oxidoreduktase. Sie verwendet in 5 ihrer 14 Untereinheiten insgesamt 9 verschiedene Eisen-Schwefel Cluster. Ein weiteres Beispiel sind die Hydrogenasen. Sie sind an der Stickstofffixierung beteiligt und katalysieren die reversible Oxidation von elementarem Wasserstoff. Hierbei werden Eisen-Schwefel-Cluster verwendet, um Elektronen durch einen größeren Protein-Komplex zu transportieren [10-12].

Zum Teil besitzen Eisen-Schwefel-Cluster auch regulatorische Funktionen, wie zum Beispiel IscR (siehe 1.2.3.5), dass die Transkription der *E. coli* Fe/S-Cluster Biosynthese reguliert. Aber auch andere Fe/S-Proteine übernehmen regulatorische Funktionen, wie zum Beispiel Aconitase [13-16].

Fe/S-Cluster können auch in manchen Fällen mit anderen Eisenzentren (Häm-Eisen) assoziiert sein, wie zum Beispiel bei der *E. coli* Sulfid Reduktase, wo ein $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster mit einer Sirohämgruppe assoziiert ist (Abb. 1.2) oder auch mit anderen Metallen, wie zum Beispiel in der Nitrogenase, welche ebenfalls für die Stickstofffixierung nötig ist, und elementaren Stickstoff mit Hilfe eines Eisen-Molybdän-Cluster und weiteren Eisen-Schwefel-Clustern reduziert [5, 6, 17].

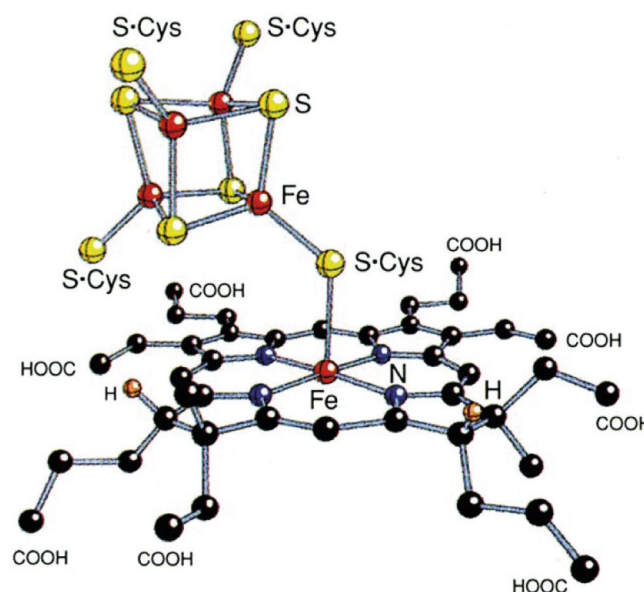


Abbildung 1.2 Fe/S-Cluster der *E. coli* Sulfid Reduktase verbrückt mit Sirohämgruppe [5].

Wie bereits erwähnt, sind die Funktionen der Eisen-Schwefel-Cluster vielseitig. Abgesehen vom Elektronentransport spielen sie, aufgrund ihres flexiblen Redoxpotentials, eine wichtige Rolle bei Redoxprozessen oder auch als Schwefeldonoren. Einen Überblick über die Funktionen gibt Tabelle 1.1 [5-7, 13, 17-24].

Tabelle 1.1 Funktionen von Eisen-Schwefel-Clustern.

Funktion	Beispiel
Elektronentransport	Atmungskette (Komplex I)
gekoppelter Elektronen/Protonentransport	Rieske Protein, Nitrogenase
Redoxaktivität	Ferredoxin
Substratbindung und Aktivierung	Aconitase
Regulation/Oxygen sensing	SoxR/SoxS-System, IscR
Strukturell	Endonuclease III
Schwefel-Donor	Biotinsynthase
Disulfidreduktion	Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase

1.2 Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern

Auch wenn Eisen-Schwefel-Cluster zu den wichtigsten Cofaktoren gehören, so ist die Biosynthese dieser Cofaktoren nicht anspruchslos. Eisen-Schwefel-Cluster können *in vitro* durch freies Eisen und freies Sulfid auf Proteinen rekonstituiert werden, wodurch die Aktivität der Proteine wiederhergestellt wird [25]. Die benötigten Mengen an freiem Eisen und freiem Sulfid jedoch wären toxisch für Zellen. Die intrazelluläre Fe/S-Cluster Biosynthese muss daher streng reguliert werden, so dass die Mengen an freiem Eisen und Sulfid minimiert werden.

In den 90er Jahren wurden die ersten Fe/S-Cluster Biosynthesysteme identifiziert und charakterisiert. Dabei wurde zunächst das Nif-System entdeckt, das ausschließlich für die Beladung von Nitrogenase mit Eisen-Schwefel-Clustern zuständig ist [26, 27]. Auf Basis dieses Systems konnte anschließend in *E. coli* das ISC-System identifiziert werden, das erste identifizierte „house-keeping“-System für die Biosynthese von Fe/S-Clustern [28, 29].

Neben dem ISC-System wurde später das SUF-System identifiziert, ein zweites System, welches in *E. coli* unter Stressbedingungen die Fe/S-Cluster Biosynthese übernimmt [30]. Das ISC- und das SUF-System sind hingegen keine hochspezialisierten Systeme, sondern transferieren die Cluster intrazellulär auf verschiedene Zielproteine.

Die Untersuchungen der Systeme, insbesondere des ISC- und SUF-Systems sind noch immer Gegenstand intensiver Forschungen, die beständig neue Erkenntnisse über die Fe/S-Cluster Biosynthese zutage bringen.

1.2.1 Gemeinsame Komponenten aller Systeme

Trotz der unterschiedlichen Systeme benötigen alle Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesysteme einige Kernkomponenten, die in jedem System vorhanden sind. Dazu gehören die Cysteindesulfurasen, die zur Mobilisierung des Schwefels benötigt werden und die so genannten Scaffoldproteine, auf denen die Eisen-Schwefel-Cluster aufgebaut werden, bevor sie zu den *apo*-Zielproteinen transferiert werden. Das Nif-System besteht nur aus diesen beiden Kernkomponenten.

1.2.1.1 Cysteindesulfurasen

Sulfid ist essentiell für den Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern, aber in freier Form toxisch für Zellen. Zur Mobilisierung des Sulfids verwenden die Fe/S-Cluster Biosynthese Systeme daher Cysteindesulfurasen. Dabei handelt es sich um homodimere Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-abhängige Enzyme, die die Desulfurierung von L-Cystein zu L-Alanin und Sulfid katalysieren [31, 32].

Die Cysteindesulfurasen lassen sich in Typ-I (NifS, IscS) und Typ-II (SufS) Desulfurasen einteilen und zeigen hohe Sequenzähnlichkeiten untereinander. Die Typ I und Typ II Desulfurasen unterscheiden sich in vier Regionen der Sequenz, darunter die PLP-Bindungsregion, sowie die Region um das konservierte aktive Cystein [33]. Der Reaktionsmechanismus hingegen scheint bei allen Cysteindesulfurasen gleich zu sein (Abb. 1.3):

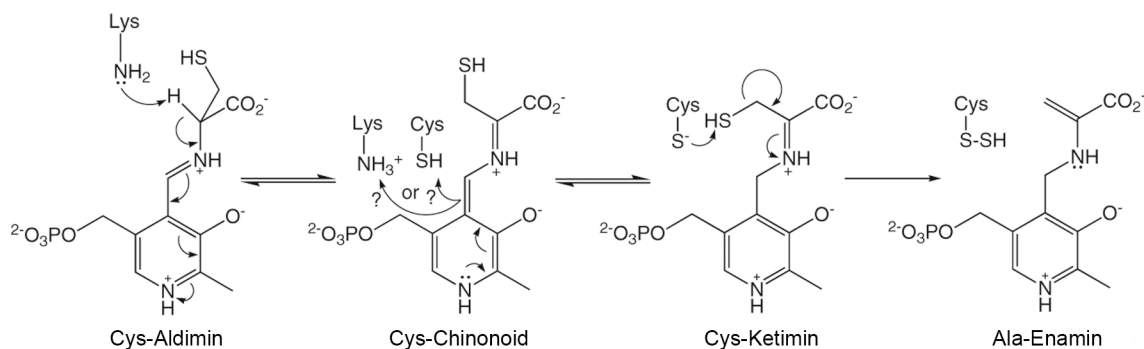


Abbildung 1.3 Reaktionsmechanismus der PLP-abhängigen Cysteindesulfurasen [33].

Zunächst wird das Cystein als Aldimin an PLP gebunden. Aus diesem Intermediat wird das α -Proton eliminiert, wodurch ein Chinonoid als Zwischenstufe entsteht. Ein Cystein oder Lysin aus der active-site reprotoniert nun das Intermediat, so dass ein Ketimin gebildet wird. Nun kann der deprotonierte Cysteinrest das Ketimin nucleophil angreifen und ein enzymgebundenes Persulfid generieren, während sich ein Alanin-Enamin am PLP bildet. Durch eine Transaldiminierung mit dem katalytischen Lysinrest wird abschließend Alanin freigesetzt [28, 33-35].

Cysteindesulfurasen werden jedoch nicht nur innerhalb der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese verwendet, sondern auch innerhalb anderer Cofaktorbiosynthesen, wie z.B. Thiamin oder auch tRNA (z.B. s⁴U 4-Thiouridin) [33, 36-38]. Einen Überblick gibt Abb. 1.4.

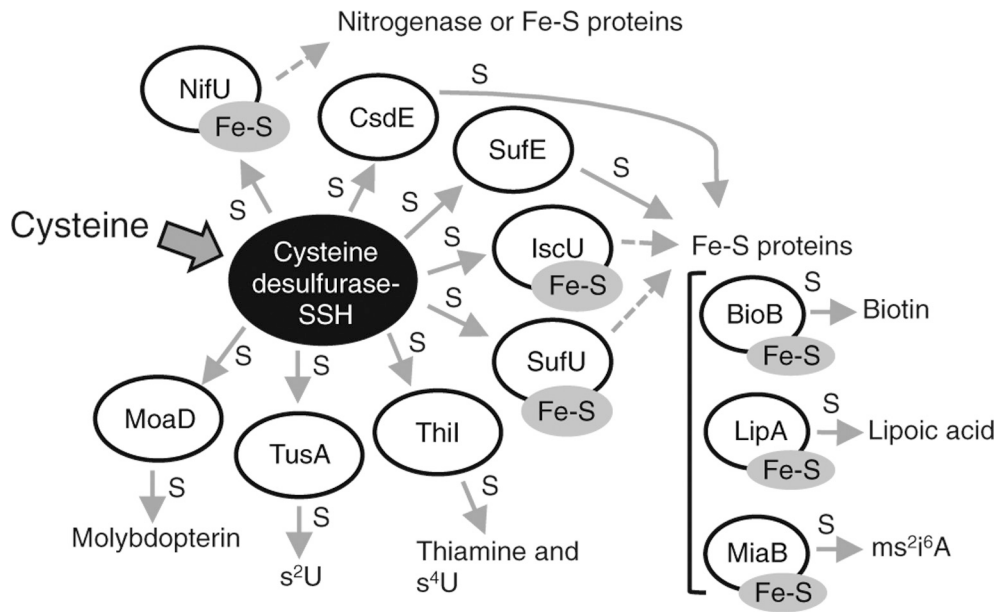


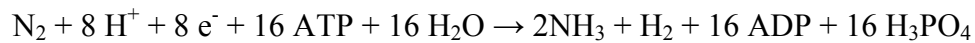
Abbildung 1.4 Biosynthesewege, in die Cysteindesulfurasen involviert sind [33].

1.2.1.2 Scaffoldproteine

Neben einer Cysteindesulfurase besitzen alle Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesesysteme mindestens ein Scaffoldprotein. Auf dem Scaffoldprotein wird der Eisen-Schwefel-Cluster gebildet und anschließend auf weitere Proteine transferiert. Man unterscheidet nach heutigem Kenntnisstand zwischen U-Typ und A-Typ Scaffolds, sowie möglicherweise auch einem B-Typ-Scaffold. Manche Biosynthesesysteme wie das ISC-System aus *E. coli* besitzen ein U-Typ und A-Typ Scaffold, während das Suf-System hingegen über ein A-Typ und B-Typ Scaffold verfügt. Die genaue Hierarchie der Scaffold-Proteine und ihrer einzelnen Funktionen ist noch unklar. Zum Teil werden die A-Typ-Scaffolds als A-Typ Transporter (A-type Carrier) bezeichnet, da man davon ausgeht, dass der Cluster auf dem U-Typ-Scaffold aufgebaut wird, aber durch das A-Typ Scaffold auf das Zielprotein übertragen wird. Weitere Details zu den Scaffold-Proteinen werden im Folgenden bei dem jeweiligen System besprochen [26, 39-43].

1.2.2 Das Nif-System

Das Nif-System war das erste identifizierte Fe/S-Clusterbiosynthesystem. Es wurde als Bestandteil des Genclusters NifUSVWZM aus *Azotobacter vinelandii* 1989 identifiziert [27]. Das Produkt dieses Genclusters ist die Nitrogenase, welche zur Stickstofffixierung benötigt wird. Dabei wird Stickstoff über den folgenden Reaktionsweg zu Ammoniak umgesetzt:



Die Elektronen werden dabei durch Ferredoxine übertragen und an der Reaktion sind mehrere Eisen-Schwefel-Cluster, sowie ein Eisen-Molybdän-Cluster beteiligt. Unter Stickstofffixierungsbedingungen ist die Nitrogenase erhöht exprimiert und hat daher einen hohen Bedarf an Eisen-Schwefel-Clustern, der durch ein eigenes System gedeckt werden muss.

1993 wurde festgestellt, dass die Proteine NifU und NifS als essentiell für die Biosynthese der Eisen-Schwefel-Cluster der Nitrogenase sind [31]. Dabei wurde NifS als Cysteindesulfurase identifiziert und NifU als Scaffold-Protein. Diese beiden Komponenten bilden dabei eine Art minimales Biosynthesesystem. Die restlichen Proteine des Genclusters sind direkt mit der Nitrogenase assoziiert. Entsprechend kommt das Nif-System auch nur in stickstofffixierenden Bakterien vor.

1.2.2.1 NifS

NifS war die erste identifizierte Cysteindesulfurase. Es ist ein Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-abhängiges Enzym, das die Desulfurierung von L-Cystein zu L-Alanin und Sulfid katalysiert (Abb. 1.3) [31, 32]. Homologe sind nicht nur in stickstofffixierenden Bakterien zu finden, sondern auch in anderen Organismen. Diese sind zum Teil mit der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese (siehe unten) oder auch mit der Biosynthese anderer Cofaktoren wie NADH assoziiert [37, 44].

1.2.2.2 NifU

Innerhalb des Nif-Systems bildet NifU ein Scaffold-Protein, auf dem Fe/S-Cluster aufgebaut werden können. Auf NifU können in der Gegenwart von L-Cystein, Fe^{2+} und NifS labile $[\text{2Fe-2S}]$ und $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster aufgebaut werden [39].

NifU ist ein homodimeres, cysteinreiches Protein, das über drei Domänen verfügt. Dabei wird zwischen einer N-terminalen, einer zentralen und einer C-terminalen Domäne unterschieden.

Die zentrale Domäne trägt einen stabilen, redox-aktiven [2Fe-2S]-Cluster, dessen Funktion noch unbekannt ist. Die N- und C-terminale Domäne sind beide in der Lage labile Fe/S-Cluster zu binden. Vermutlich werden auf der N-terminalen Domäne Fe/S-Cluster assembliert und durch die C-terminale Domäne übertragen [33, 39]. Dafür spricht, dass die N-terminale Domäne homolog zu IscU und anderen U-Typ-Scaffolds ist, welche für die *de novo* Assemblierung von Fe/S-Clustern in anderen Biosynthesesystemen zuständig sind (siehe unten).

1.2.3 Das ISC-System

Das Isc-System (ISC: Iron-Sulfur-Cluster) war das erste Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesesystem, was als house-keeping Biosynthesesystem identifiziert werden konnte. Es wurde zunächst in *Azotobacter vinelandii* identifiziert und existiert in homologer Form in *E. coli* [29]. Das Biosynthesesystem besteht aus mehreren Komponenten, die in einem Gencluster codiert sind (Abb. 1.5) [45].

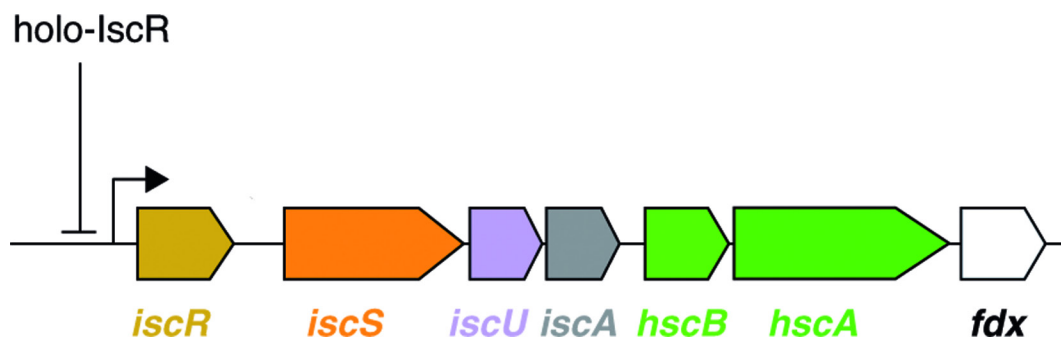


Abbildung 1.5 Isc-Gencluster aus *E. coli* nach [41] Gelb: Regulator, orange: Cystein-desulfurase, violett: scaffold, blau: A-Typ-Transporter, grün: Chaperon, weiß: Ferredoxin [45].

In diesem finden sich die zu NifU und NifS homologen Proteine IscU und IscS, ein weiteres potentiell Scaffold IscA, die Chaperone HscB und HscA, das Ferredoxin Fdx und der Transkriptionsregulator IscR. Dieses System stellt das „house-keeping“-System für die Fe/S-Cluster Biosynthese unter Normalbedingungen in *E. coli* und vielen weiteren Organismen dar.

1.2.3.1 IscS

IscS (Abb. 1.6) ist die Cysteindesulfurase des Isc-Systems. Sie zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu NifS, im Besonderen sind die Bereiche der PLP-Bindungsstelle und des active-site Cysteins hochkonserviert. Es gehört daher zu den Typ I Cysteindesulfurasen und liegt als Homodimer vor. Der Reaktions-mechanismus ist analog zu NifS und den anderen Cysteindesulfurasen, der Schwefel wird als Persulfid gebunden und kann auf diese Weise weitergegeben werden.

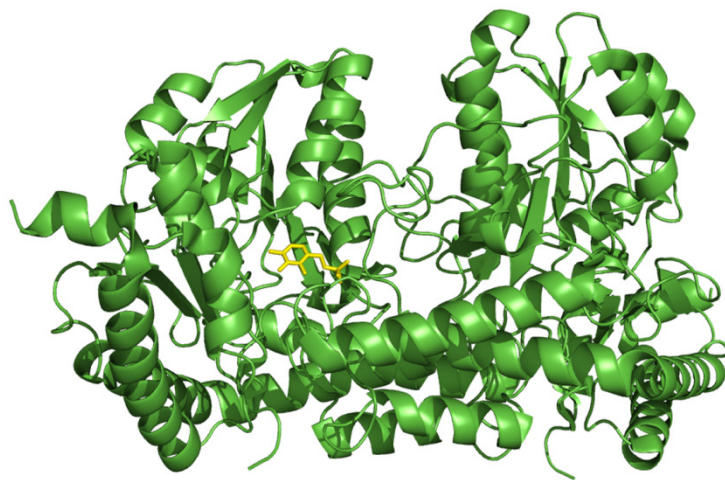


Abbildung 1.6 *E. coli* IscS -Monomer (PDB-Code: 1P3W), PLP-Cofaktor in Gelb dargestellt. Aktives Cystein in der Kristallstruktur nicht sichtbar.

Trotz der großen Sequenzähnlichkeit zu NifS sind die beiden Proteine nicht in der Lage einander zu ersetzen. So wurde in *Azotobacter vinelandii* gezeigt, dass der Wildtyp-Phänotyp in einer IscS-Deletionsmutante nicht durch die Expression von NifS wiederhergestellt werden kann [46]. In *E. coli* ist die Deletion von IscS ebenfalls letal, was sich jedoch nicht auf einen Mangel in der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese zurückführen lässt, sondern darauf, dass IscS neben der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese auch in die Thiamin-Biosynthese eingebunden ist [37].

Nachgewiesen ist, dass IscS mit IscU interagiert und in der Lage ist Sulfid auf IscU zu transferieren (Abb. 1.7). Dies konnte sowohl für *E. coli* als auch für *A. vinelandii* gezeigt

werden [39, 47, 48]. In beiden Fällen wird dabei ein kovalenter Komplex zwischen den beiden Enzymen postuliert, wobei sich jedoch die beteiligten Reste von IscU, die für die Ausbildung der Bindung ausschlaggebend sind, unterscheiden. So wird für die *E. coli* IscS/IscU Interaktion eine kovalente Bindung zwischen IscU-Cys63 und IscS-Cys 328 gefunden, während in *A. vinelandii* vermutlich IscU-Cys37 in die Bindung involviert ist [47, 48]. Es wurde auch gefunden, dass IscU in der Lage ist IscS zu aktivieren, jedoch nur eine geringe Steigerung der Aktivität um Faktor 6 beobachtet wurde [48-50].

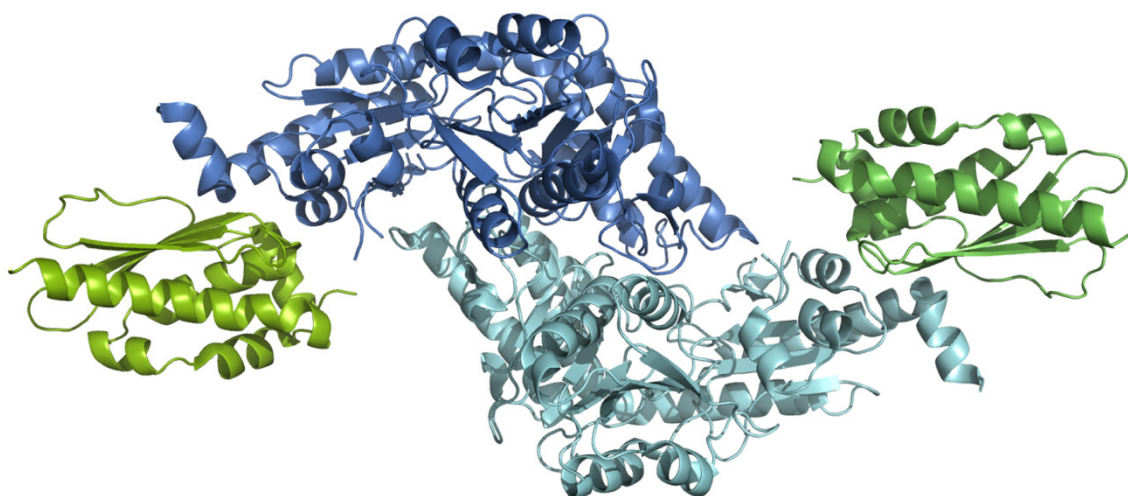


Abbildung 1.7 Heterotetramerer Komplex aus IscU (grün) und IscS (blau) von *E. coli* (PDB-Code: 3LVL).

1.2.3.2 IscU und IscA

Das Isc-System verfügt über zwei Scaffold-Proteine IscU und IscA. Wie die Benennung bereits andeutet, gehört IscU zu den U-Typ- und IscA zu den A-Typ-Scaffolds oder den A-Typ Transportern. Die Hierarchie zwischen den beiden Scaffoldproteinen und die Funktion von IscA sind derzeit noch umstritten.

IscU ist homolog zum N-Terminus von NifU und verfügt über drei hochkonservierte Cysteinreste, die für die Koordination des Eisen-Schwefel-Clusters verantwortlich sind. Neben den hochkonservierten Cysteinresten existiert ein hochkonserviertes und invariantes Aspartat, welches vermutlich eine wichtige Rolle bei der Freisetzung des Clusters spielt [51].

IscU ist in der Lage direkt mit IscS zu interagieren und kann Sulfid durch IscS erhalten, was sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* gezeigt wurde [39, 40, 47, 48, 52].



Abbildung 1.8 NMR-Struktur von *E. coli* IscU_D39A (PDB-Code: 2KQK): konservierte, clusterbindende Cysteinreste in Gelb markiert, Rot zeigt die LPPVK-Sequenz zur Bindung des HscA/B Chaperonkomplexes (siehe unten).

Strukturell konnte gezeigt werden, dass IscU, wenn kein Eisen-Schwefel-Cluster gebunden ist, in zwei Konformationen vorliegt, in einer ungeordneten Konformation und einer geordneten Konformation. Beide Konformationen gehen langsam ineinander über, wobei die geordnete Konformation durch die Zugabe von ZnCl_2 , die ungeordnete Konformation dagegen durch Zugabe von EDTA begünstigt wird [53-55].

IscU ist in der Lage, Eisen-Schwefel-Cluster zu binden und zu bilden. Dies geschieht sequenziell, indem zunächst ein $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster auf einem Monomer gebildet wird. Daraufhin bilden zwei Monomere einen Komplex, so dass 2 $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster auf einem IscU Dimer vorliegen. Anschließend können diese Cluster durch reduktive Kupplung zu einem $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster auf einem IscU Dimer vereint werden [40, 56, 57].

Die reduktive Kupplung kann dabei *in vitro* durch Dithionit oder *in vivo* durch Ferredoxin als Elektronendonator erfolgen. Der Cluster kann anschließend auf potenzielle Zielproteine transferiert werden, wobei gezeigt werden konnte, dass sowohl $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster als auch $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster transferiert werden können [58-60].

Insgesamt ist unstrittig, dass IscU als Scaffold Protein fungiert, auf dem ein Eisen-Schwefel-Cluster durch Hilfe von IscS aufgebaut wird.

Im Gegensatz dazu steht die Funktion von IscA noch immer in Frage. *In vitro* Studien deuten darauf hin, dass IscA als Scaffold oder Eisen-Chaperon fungieren kann [41, 42, 61-65]. Zur Zeit gilt als am wahrscheinlichsten, dass IscA als intermediärer Träger des Eisen-Schwefel-Clusters fungiert, da gezeigt werden konnte, dass IscA [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Cluster binden und auf eine Reihe von Zielproteinen transferieren kann [41, 42, 63, 64].

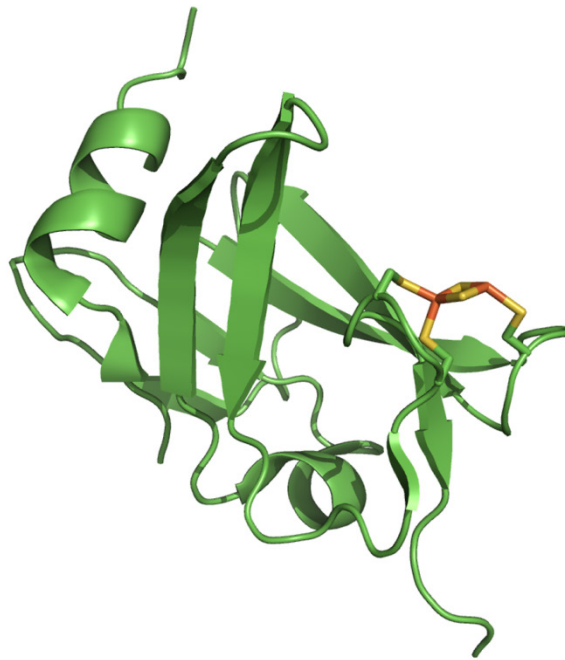


Abbildung 1.9 *E. coli* IscA mit gebundenem [2Fe-2S]-Cluster (PDB: 1X0G). Der Cluster ist an drei hochkonservierte Cysteinreste gebunden.

Es konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass IscA in der Lage ist Eisen zu binden und das gebundene Eisen auf IscU transferieren kann, was auch auf eine potentielle Rolle als Eisen-Chaperon und –Donor hindeutet [61]. Da IscA jedoch mit gebundenem Cluster gereinigt werden kann, eine Interaktion mit IscS jedoch bisher nicht nachgewiesen werden konnte, geht man davon aus, dass der Cluster auf IscU aufgebaut wird und auf IscA als intermediären Träger übertragen wird, von dem es auf weitere Zielproteine übertragen wird [64, 66]. Dies wird dadurch gestützt, dass bisher nur ein irreversibler Clustertransfer von IscU zu IscA nachgewiesen werden konnte [42, 62, 67].

1.2.3.3 Das HscA/HscB-Chaperon-System

Im ISC-Gencluster liegen unmittelbar downstream zu *IscA* die Chaperone *HscA* und *HscB* (Abb. 1.5). Diese Chaperone bilden einen Komplex, der mit *IscU* interagiert und einen ternären Komplex bildet. *HscA* besitzt ATPase-Aktivität, die durch die konservierte LPPVK Sequenz von *IscU* (Abb. 1.8) stimuliert wird. Die N-terminale J-Domäne von *HscB* reguliert die ATPase-Aktivität von *HscA*, während die C-terminale Domäne von *HscB* spezifisch mit *IscU* interagiert [68-72]. Die ATP-Hydrolyse ist dabei an die Komplexbildung des *HscB*-*HscA*-*IscU*-Komplexes gekoppelt [73].

Die Bindung des Chaperonsystems sorgt dabei für eine strukturelle Störung des [2Fe-2S]-Clusters, der an *IscU* gebunden ist und erleichtert so möglicherweise dessen Transfer. So konnte gezeigt werden, dass der Clustertransfer eines [2Fe-2S]-Clusters von *IscU* auf Ferredoxin durch *HscAB* stimuliert werden kann [73]. Für [4Fe-4S]-Cluster auf *IscU* konnte hingegen keine Stimulation nachgewiesen werden [60]. Eine Interaktion von *HscA/B* mit *IscA* ist hingegen nicht bekannt.

1.2.3.4 Das Ferredoxin *Fdx*

Neben den Scaffoldproteinen, der Cysteindesulfurase und dem Chaperonsystem existiert noch das Ferredoxin *Fdx* in dem Gencluster. In *E. coli* wurde gezeigt, dass die Deletion von *Fdx* zu einer verminderten Aktivität von Eisen-Schwefel-Proteinen führt [74]. Später konnte gezeigt werden, dass *Fdx* als Elektronendonator für die reduktive Kupplung von [2Fe-2S]-Clustern auf *IscU* fungieren kann, was vermutlich dessen hauptsächliche Aufgabe ist [56].

1.2.3.5 Der Transkriptionsregulator *IscR*

Die letzte Komponente innerhalb des ISC-Genclusters ist der Transkriptionsregulator *IscR*. Dieser Transkriptionsregulator ist in der Lage einen [2Fe-2S]-Cluster zu binden und so von seiner *apo*- in die *holo*-Form überzugehen. Als *holo*-*IscR* unterbindet der Transkriptionsregulator die Expression des *Isc*-Systems und stellt so sicher, dass keine Überproduktion an Eisen-Schwefel-Clustern durch das *Isc*-System stattfindet. In seiner *apo*-Form hingegen aktiviert *IscR* hingegen das *Suf*-Operon (siehe unten) [14-16]. So kann durch *IscR* der Bedarf an Eisen-Schwefel-Clustern innerhalb der Zellen sensitiv gesteuert werden.

1.2.3.6 Zusammenfassung des Isc-Systems

Abb. 1.10 fasst den Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern durch das Isc-System zusammen. Die Transkription wird durch den Transkriptionsregulator IscR reguliert. Ein unbekannter Eisendonator (siehe Abschnitt 1.3) transferiert Eisen auf IscU, während IscS Sulfid transferiert. Die Reihenfolge, in der Eisen- und Sulfidtransfer erfolgen, sind noch immer Gegenstand von Spekulationen, sowohl ein „Fe first, S second“ als auch ein „S first, Fe second“ Modell werden diskutiert. Auf IscU werden zunächst [2Fe-2S] Cluster assembliert und diese anschließend entweder transferiert oder durch Ferredoxin reduktiv zu [4Fe-4S]-Clustern gekoppelt. Anschließend werden die Cluster entweder direkt zu Zielproteinen oder auf andere A-Typ Transporter transferiert, von wo aus sie zum Zielprotein transferiert werden [33].

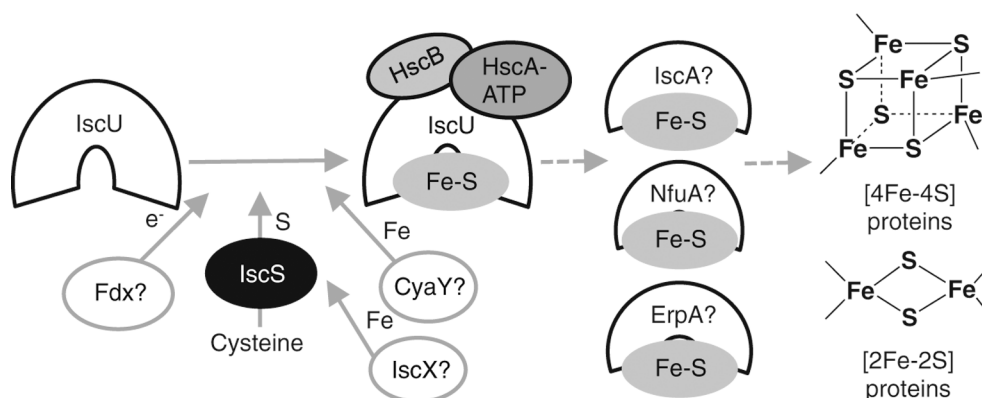


Abbildung 1.10 Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese durch das Isc-System nach [33].

Das Isc-System ist ein weit verbreitetes System innerhalb der Bakterien mit Ausnahme des Firmicutes Phylums, welche nur über ein Suf-System verfügen. Darüber hinaus findet sich das Isc-System in höheren Eukaryoten in geringfügig abgewandelter Form als House-keeping System, unter anderem in Hefe und sogar dem Menschen [75, 76]. In höheren Organismen findet sich das Isc-System in den Mitochondrien, wo es um einige Faktoren erweitert ist, zum Beispiel zum Transport von Eisen durch die mitochondriale Membran. Die essentiellen Kernkomponenten wie Cysteindesulfurase und Scaffoldprotein sind jedoch immer noch vorhanden und weisen eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu ihren bakteriellen Vorläufern auf.

1.2.4 Das Suf-System

Viele Prokaryoten verfügen neben dem Isc-System über ein weiteres System zur Assemblierung von Eisen-Schwefel- Clustern: das Suf-System. Während das Isc-System als „house keeping“-System dient, handelt es sich bei dem Suf-System um ein Backup-System, das unter Stressbedingungen, wie Eisenmangel oder oxidativem Stress exprimiert wird [16, 77, 78].

Das Suf-System wurde in *E. coli* 2002 identifiziert und erstmals charakterisiert [30]. Es besteht aus 6 Proteinen und ist einem Gencluster *sufABCDSE* (Abb. 1.11) codiert. Im Gegensatz zum Isc-System besitzt dieses System keinen eigenen Regulator, es wird über die globalen Regulatoren Fur und OxyR reguliert [77-79].

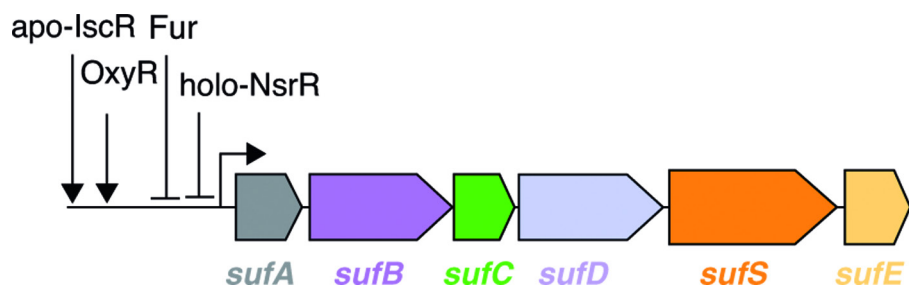


Abbildung 1.11 Gencluster des Suf-Systems aus *E. coli* (Nach [42]). Blau: A-Typ-transporter, violett: potentielles Scaffold, grün: ATP-Hydrolyse, orange: Cysteindesulfurase [33].

1.2.4.1 Das Cysteindesulfurase-System SufSE

Auch das Suf-System mobilisiert den Schwefel, der für die Biosynthese von Fe/S-Clustern benötigt wird, durch eine Cysteindesulfurase. Anders als beim Isc-System jedoch, ist diese Cysteindesulfurase zunächst inaktiv und transferiert das Sulfid nicht direkt auf das designierte Scaffold-Protein SufA oder auch SufB. Stattdessen besitzt das Suf-System ein Schwefel-Akzeptorprotein SufE [80].

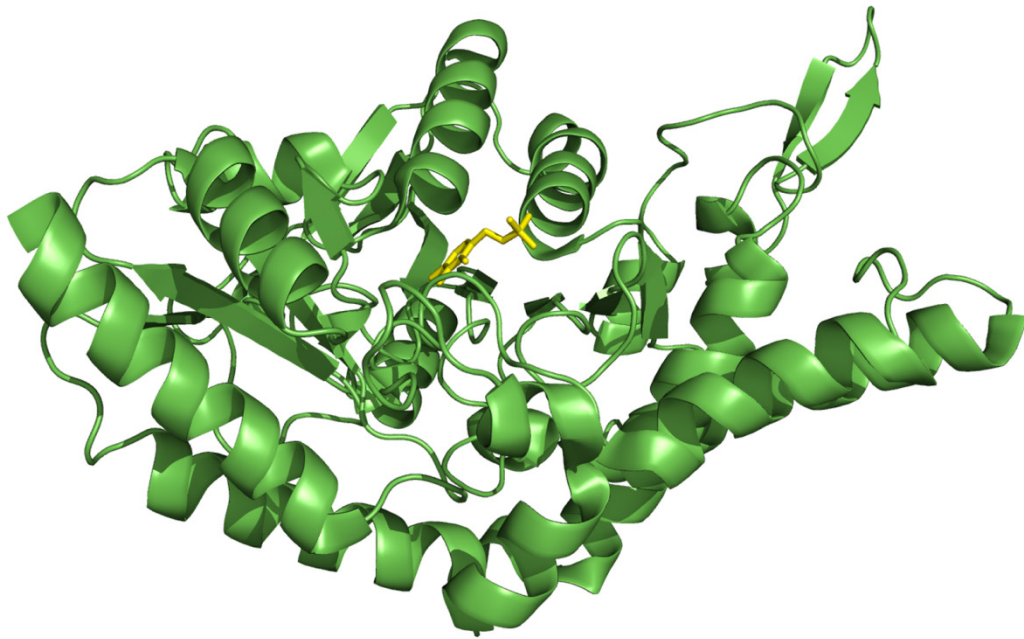


Abbildung 1.12 Kristallstruktur von SufS (PDB-Code:1C0N) aus *E. coli*, der PLP-Cofaktor ist gelb markiert.

SufS (Abb. 1.12) ist ebenfalls eine PLP-abhängige Cysteindesulfurase, die nach dem vorher beschriebenen Mechanismus arbeitet. Es handelt sich auch hier um ein Homodimer. SufE (Abb. 1.13) hingegen kommt nur im Suf-System vor.

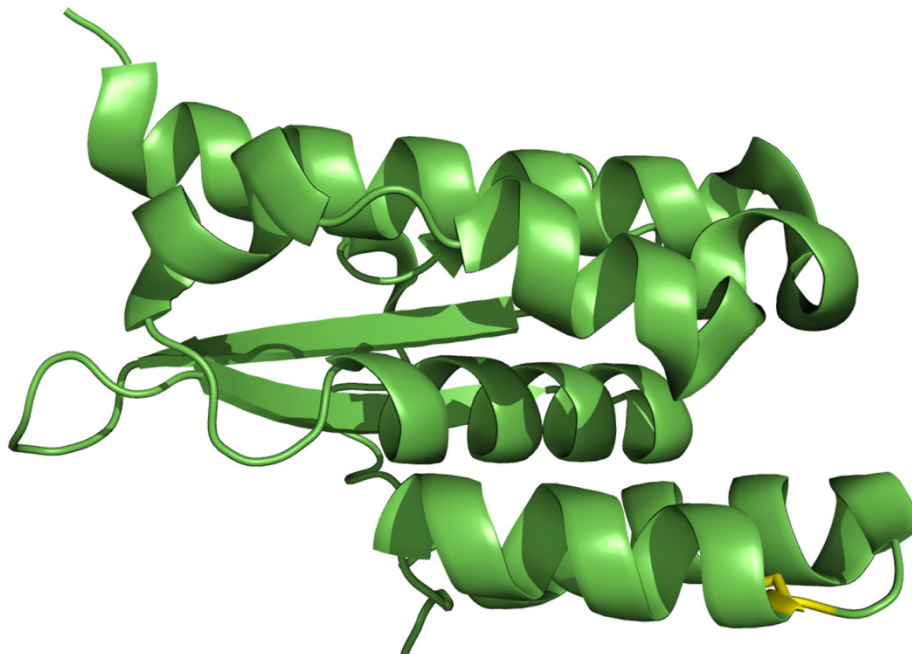


Abbildung 1.13 Kristallstruktur von *E. coli* SufE (PDB-Code: 1MZG), das aktive Cystein gelb markiert.

Für das Suf-System kann man SufSE als Einheit ansehen, da SufS ohne SufE nahezu inaktiv ist. SufE ist in der Lage SufS zu aktivieren und dessen Aktivität deutlich zu steigern, aber durch die Interaktion mit weiteren Komponenten des Komplexes kann die Aktivität der Cysteindesulfurase noch weiter gesteigert werden (siehe unten) [80].

1.2.4.2 Der SufBCD-Komplex

Sowohl im Isc- als auch im Suf-System existiert ein ATP-hydrolysierendes System. Während es sich dabei im Isc-System um das recht gut charakterisierte HscAB-Chaperon-System handelt, so findet sich im Suf-System der SufBCD Komplex, dessen Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Sicher ist, dass der Komplex essentiell für die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese unter oxidativem Stress und Eisenmangel-Bedingungen ist [30].

SufC ist eine ATPase, die sowohl strukturell als auch auf Sequenzebene Ähnlichkeiten mit ABC-Transportern aufweist (Abb. 1.14). Sie bildet ein Dimer aus, welches mit SufB und SufD interagiert und ein sehr stabiles SufBC₂D Heterotetramer bilden kann [81-83].

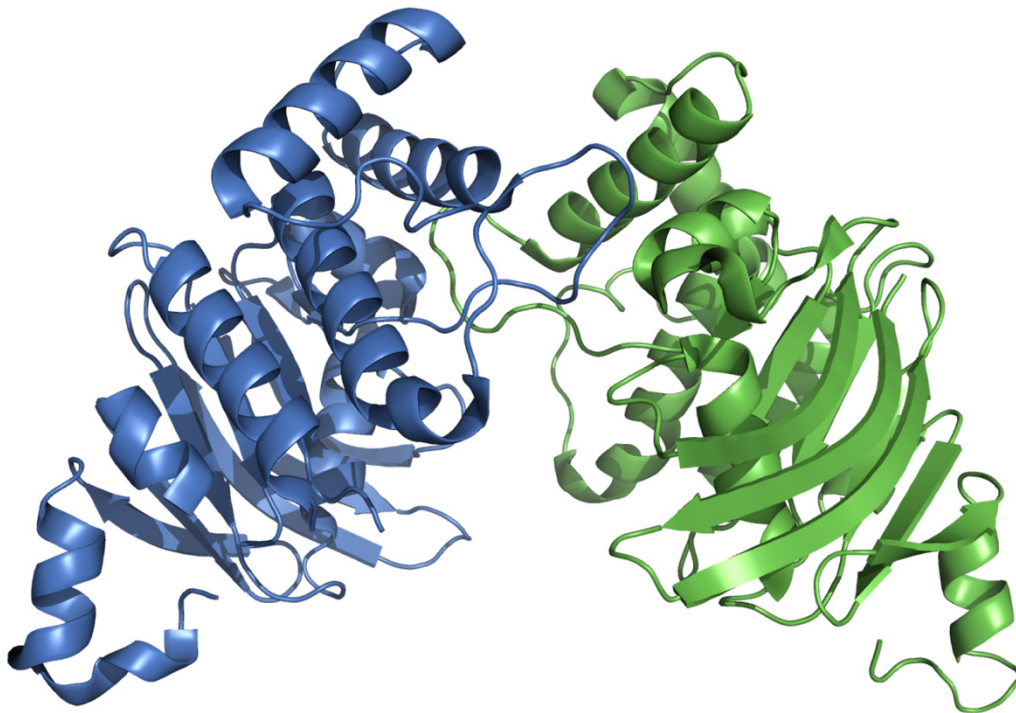


Abbildung 1.14 Kristallstruktur des *E. coli* SufC Dimers (PDB-Code: 2D3W).

Die Bindung von SufB oder SufD an SufC steigert die basale ATPase-Aktivität von SufC deutlich [81, 83]. Es konnten verschiedene Komplexzustände nachgewiesen werden, und ein SufC₂D₂ Komplex kristallisiert werden [84]. Neue Forschungen zeigen, dass es innerhalb der Fe/S-Cluster Biosynthese auch zu einem Wechsel zwischen verschiedenen Konformationen kommt [85].

Der SufBCD Komplex ist in der Lage mit SufSE zu interagieren und die Cystein-desulfuraseaktivität des SufSE-Komplexes zu steigern. Der vermeintliche Grund ist, dass das Sulfid von SufE auf SufB transferiert wird [86].

SufB ist in der Lage, als Scaffold-Protein zu fungieren. Es kann Schwefel durch SufSE erhalten und mit diesem [4Fe-4S]-Cluster aufbauen und auf *apo*-Fe/S-Proteine transferieren [43, 86]. SufB verfügt darüber hinaus über gebundenes FAD, das Eisen(III) reduzieren kann.[87] Die Bindung von [2Fe-2S]-Clustern konnte auf SufB nicht nachgewiesen werden, die Coexpression von SufSE und SufBCD führte jedoch dazu, dass SufB mit gebundenem [4Fe-4S]-Cluster gereinigt werden konnte [85, 86].

Die Funktion von SufB als Scaffold scheint als gesichert zu gelten, die Rollen von SufC und SufD sind noch weitgehend unklar, wobei neue Erkenntnisse darauf hindeuten, dass die ATPase-Aktivität essentiell für die Eisenakquirierung von SufB ist. Dies konnte durch verschiedene Coexpressions- und Copurifikationsexperimente gezeigt werden. Daraus konnte folgender Mechanismus für den Clusteraufbau auf SufB ermittelt werden (Abb 1.15):

Die ersten Schritte involvieren einen SufB₂C₂-Komplex und SufSE. Zunächst wird Sulfid durch SufSE auf SufB übertragen (1 und 2). Der mit Sulfid beladene SufB₂C₂-Komplex interagiert anschließend mit SufCD, wobei sich ein SufBC₂D Komplex bildet (3). Dieser Komplex ermöglicht den Transfer und die mögliche Reduktion des Eisens auf SufB(4). Der nun Eisen- und Sulfid-beladene Komplex löst sich erneut, um wieder einen SufB₂C₂-Komplex zu bilden (5). Dieser Zyklus wiederholt sich mehrere Male, bis schlussendlich der SufB₂C₂ Komplex zwei [4Fe-4S]-Cluster aufgebaut hat und so den Zyklus zu verlassen kann (6). Wie oft dabei der Zyklus durchlaufen wird und wie oft der SufBC₂D Komplex im Verlauf dessen gebildet wird ist noch genauer zu untersuchen [85].

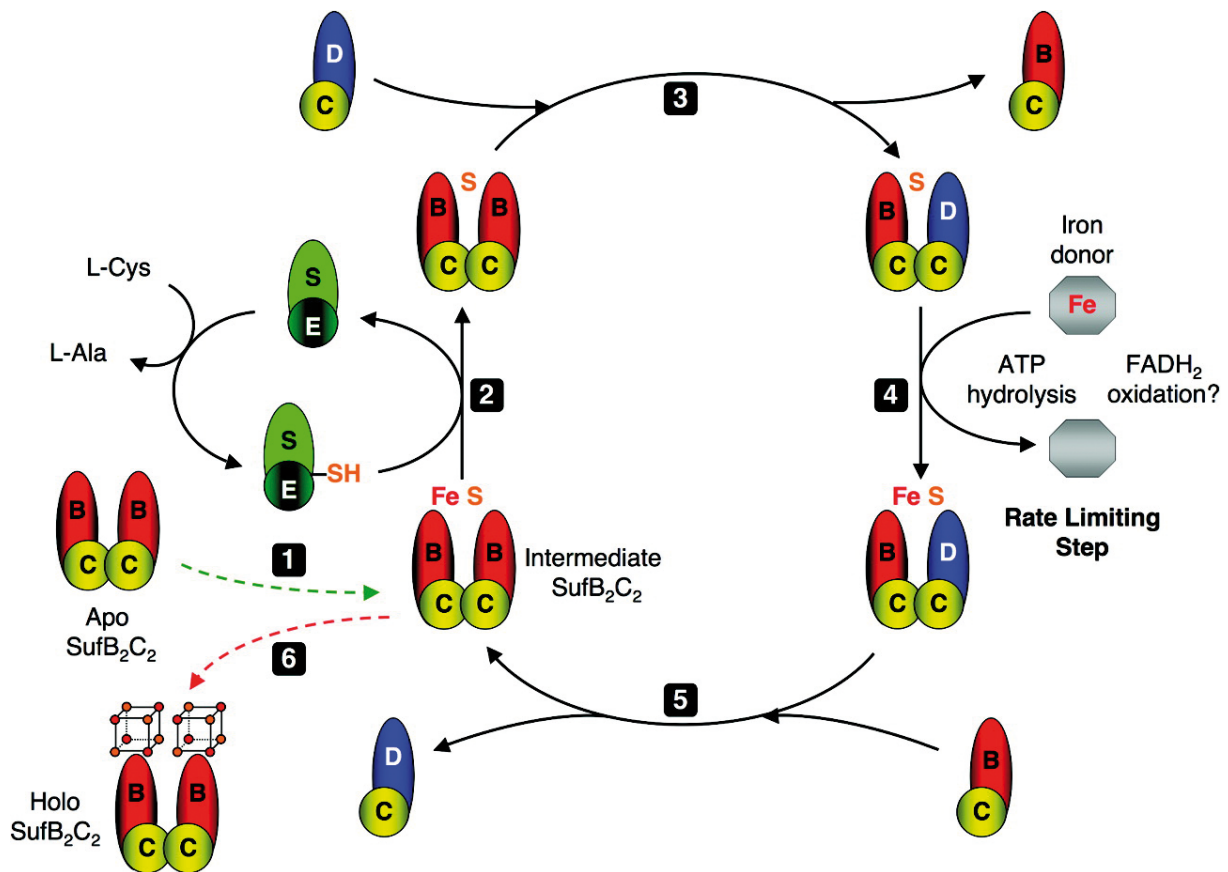


Abbildung 1.15 Möglicher Aufbau des Fe/S-Clusters auf SufB innerhalb des Suf BCD-Komplexes [85].

Die Eisenquelle dieses Systems ist noch unklar, jedoch wird spekuliert, dass SufB durch den gebundenen Flavin Cofaktor in der Lage ist Eisen aus Eisen(III)-Citrat oder anderen Eisen(III)-Quellen direkt zu mobilisieren und so gegenüber dem Isc-System unter Stressbedingungen einen Vorteil gegenüber dem Isc-System hat [87].

1.2.4.3 SufA

Die letzte Komponente des Suf-Systems ist das potentielle Scaffold SufA (Abb. 1.16). Es ist sequenzhomolog zu IscA und kann [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Cluster binden und an *apo*-Zielproteine transferieren [64, 88]. Wenn SufA mit SufBCDSE coexprimiert wird, kann das Protein mit einem [2Fe-2S]-Cluster aufgereinigt werden [88]. Auch hier stellt sich die Frage, ob SufA eher ein Scaffold oder ein intermediäres Transportprotein ist. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Sulfid von SufSE auf SufA transferiert werden kann, jedoch konnte eine Interaktion der beiden Proteine bislang nicht nachgewiesen werden [89].



Abbildung 1.16 Kristallstruktur von SufA (PDB-Code: 2D2A), Clusterbindende Cysteine gelb markiert.

Im Gegensatz zu SufBCD ist SufA auch nicht in der Lage SufSE zu aktivieren und die Cysteindesulfuraseaktivität zu verstärken. Allerdings konnte gezeigt werden, dass SufA mit SufBCD interagiert und ein Eisen-Schwefel-Cluster von SufBCD auf SufA transferiert werden kann, der umgekehrte Fall jedoch nicht möglich ist [90]. Darüber hinaus schränkt SufA die Interaktion von SufBCD mit SufSE je nach gewähltem Verhältnis unterschiedlich stark ein, was darauf hindeutet, dass SufA und SufSE eine gemeinsame Bindungsstelle am SufBCD-Komplex besitzen [90].

Dies spricht dafür, dass es sich bei SufA analog zu IscA nicht um ein Scaffold-Protein im eigentlichen Sinne handelt, sondern, wie auch schon bei IscA, eher um einen intermediären Transporter [64].

1.2.4.4 Regulation des Suf-Systems

Im Gegensatz zum Isc-System verfügt das Suf-System nicht über einen eigenen Regulator, sondern wird durch globale Regulatoren reguliert. Da es sich nicht um ein „house-keeping“-system handelt, sondern um ein Ergänzungssystem unter Stressbedingungen, wird es auch durch die globalen Stressregulatoren reguliert. Die beiden wichtigsten dabei sind Fur und damit auch PerR, sowie OxyR. Diese steuern die Proteinexpression unter

Eisenmangelbedingungen und oxidativem Stress. Neben diesen Regulatoren wird das System durch IscR und NsrR reguliert [91-93].

Diese vielfältige Regulation des zweiten Systems ermöglicht es der Zelle ihre die Produktion der Fe/S-Cluster genau an den Bedarf anzupassen.

OxyR und *apo*-IscR sind Aktivatoren, während Fur und NsrR, ein Stickoxid sensibler negativer Regulator, die Expression reprimieren. Das Suf-System kann so unter verschiedenen Stressbedingungen aktiviert werden und, sofern es von seiner Regulation losgelöst und kontinuierlich exprimiert wird, auch das Isc-System ersetzen [94].

1.2.4.5 Zusammenfassung der Fe/S-Cluster Biosynthese durch das Suf-System

Abb. 1.17 fasst die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern durch das Suf-System zusammen. Wenn das System unter Stressbedingungen aktiviert wird, kann Schwefel über das SufSE-System aus Cystein mobilisiert werden. Vermutlich ist der SufBCD-Komplex durch das gebundene FAD fähig, Eisen direkt zu mobilisieren und für den Aufbau des Fe/S-Clusters zu verwenden. Durch Interaktion des SufSE-Komplexes mit SufBCD kann ein Eisen-Schwefel-Cluster aufgebaut werden, welcher entweder direkt auf die Zielproteine transferiert werden kann oder zunächst auf den intermediären Transporter SufA transferiert wird, von wo es an andere *apo*-Fe/S-Proteine weiter gegeben werden kann.

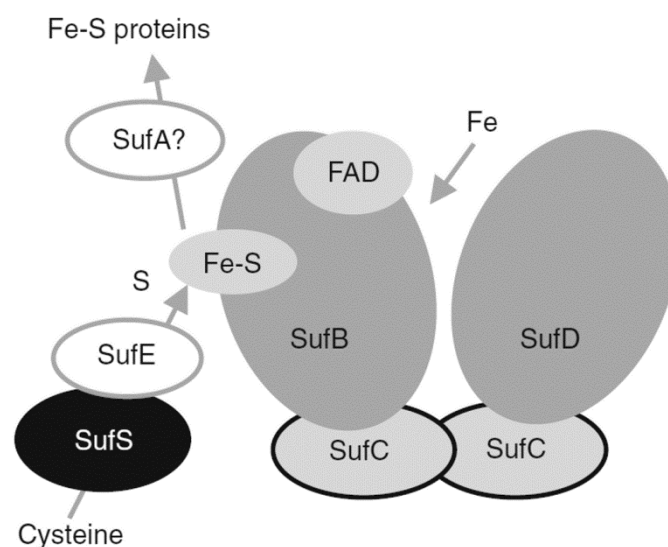


Abbildung 1.17 Übersicht über die Fe/S-Cluster Biosynthese durch das Suf-System [33].

1.2.5 A-Typ – Transporter (A-type carrier)

Sowohl im *E. coli* Isc- als auch im Suf-System tauchen A-Typ-Proteine auf. Früher als Scaffoldproteine klassifiziert, ist die heutige Meinung, dass es sich bei diesen Proteinen um intermediäre Transporter handelt, die einen bereits assemblierten Eisen-Schwefel-Cluster übernehmen und an *apo*-Fe/S-Proteine transferieren. Neben IscA und SufA jedoch existieren noch einige weitere Proteine, die sich dieser Klasse zuordnen lassen und trotzdem teilweise für die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese essentiell sind. Dazu gehört auch ErpA.

ErpA wurde mittels BLAST-Analyse in *E. coli* identifiziert. Das Protein weist 40% Sequenzidentität zu IscA bzw. 34% zu SufA auf, darunter auch die drei konservierten invarianten Cysteinreste, die zur Bindung des Eisen-Schwefel-Clusters benötigt werden. Wie IscA und SufA konnte gezeigt werden, dass es [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Cluster binden kann und diesen auf *apo*-Proteine zu transferieren.

Die Analyse von Deletionsmutanten zeigte, dass ErpA essentiell für das Wachstum von *E. coli* unter aeroben Bedingungen ist. Seine Funktion konnte unmittelbar mit der Isoprenoid-Biosynthese verbunden werden, vermutlich ist ErpA essentiell für den Clustertransport zum Isoprenoid-Biosynthesystem [45, 63, 64].

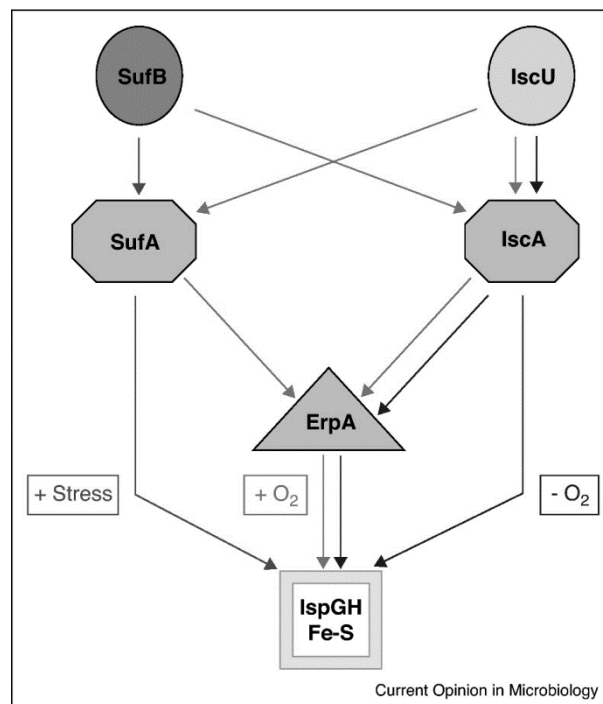


Abbildung 1.18 Übersicht über den Fe/S-Cluster Transport durch A-Typ-Transporter [45].

ErpA kann jedoch unter verschiedenen Stressbedingungen wieder komplementiert werden, So kann ErpA vermutlich unter anaeroben Bedingungen durch IscA ersetzt werden, während oxidativer Stress oder Eisen-Mangel einen Ersatz durch SufA ermöglicht (Abb. 1.18) [45, 63, 64].

Die genauen Mechanismen und Einsatzgebiete der A-Typ Transporter sind noch ungeklärt, ebenso wie die Frage, ob es weitere A-Typ-Transporter gibt. Es zeigt sich jedoch, dass die A-Typ Transporter unabhängiger von den jeweiligen Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesystemen sind, da sowohl IscA, als auch SufA jeweils von IscU oder SufBCD mit einem Eisen-Schwefel-Cluster beladen werden können. Auch ist es für die Zielproteine unabhängig, welcher A-Typ Transporter (IscA oder SufA) den Cluster transportiert [45, 64].

1.2.6 Varianten der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesysteme

Das Isc-System und das Suf-System sind die vorherrschenden Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesysteme in den meisten Bakterien. Das Isc-System liegt in nahezu allen Bakterienstämmen als House-Keeping-System vor, mit einer Ausnahme: dem Phylum der Firmicutes.

1.2.6.1 Das SufCDSUB-System der Firmicutes

In der Gruppe der Gram-positiven Firmicutes findet sich im Gegensatz zu den anderen Bakterienstämmen kein Isc-System. Die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese wird durch ein modifiziertes Suf-System übernommen, dass kein A-Typ-Scaffold enthält, sondern ein U-Typ-Scaffold SufU. Auch ein SufE-Protein ist innerhalb dieses Suf-Systems nicht vorhanden.

Die Charakterisierung des SufCDSUB-Systems von *Bacillus subtilis* war das vorrangige Ziel dieser Arbeit.

1.2.6.2 Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesysteme höherer Organismen

Die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern in Eukaryoten findet in den Mitochondrien statt. In diesen findet sich, wie bereits erwähnt, eine Variante des Isc-Systems zum Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern. Neben diesem Isc-System zum Aufbau existiert eine weitere Maschinerie, die CIA-Maschinerie zur Assemblierung und Distribution der Cluster im Cytosol (Abb. 1.19) [75, 95].

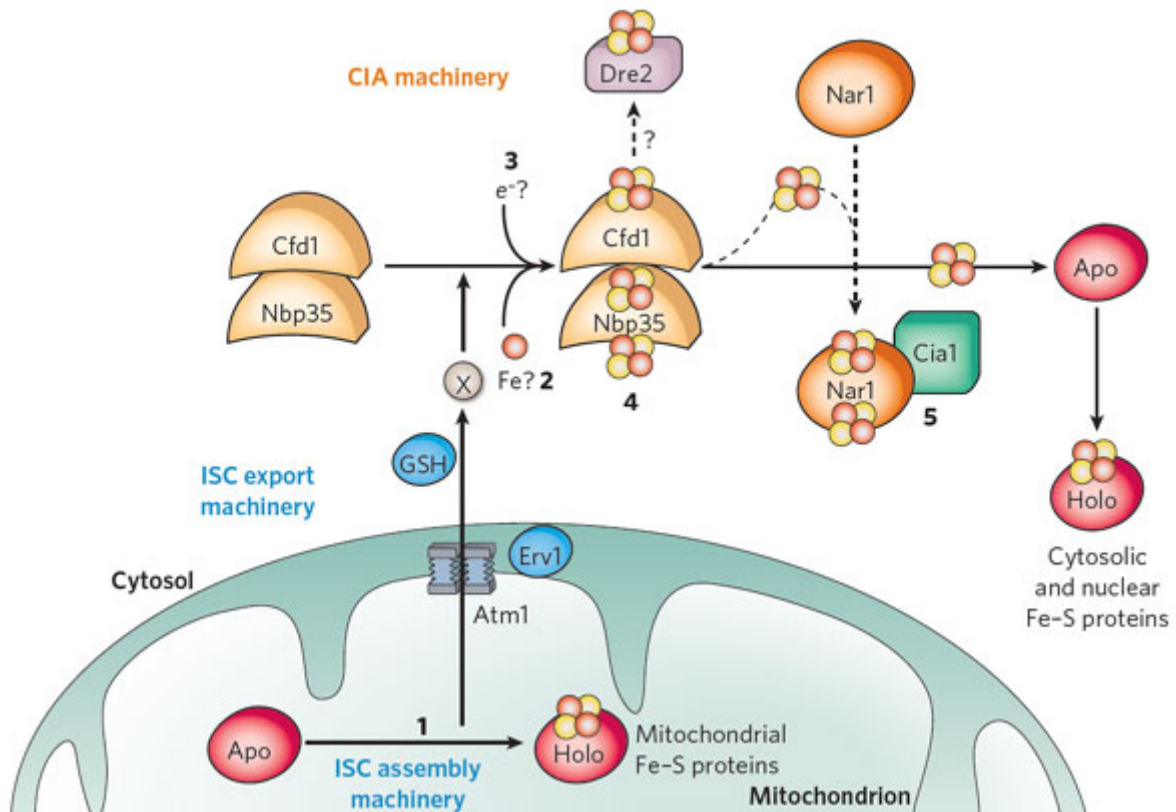


Abbildung 1.19 CIA-Maschinerie der Hefe zur Eisen-Schwefel-Cluster Distribution im Cytosol [95].

Die Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster im Cytosol erfolgt durch den Cfd1/Nbp35-Komplex. Aus dem Mitochondrium wird durch den ABC-Transporter Atm1 eine unbekannte Komponente X in das Cytosol transportiert, die für die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese benötigt wird. Unterstützt wird der ABC-Transporter durch das Tripeptid Glutathion (GSH) und die intermembranäre Sulfydryl-Oxidase Erv1. Durch diese unbekannte Komponente werden auf dem P-loop NTPase-Komplex Cfd1/Nbp35 Eisen-Schwefel-Cluster aufgebaut, wobei der Eisendonator und mögliche Elektronendonoren noch unklar sind. Die labilen Eisen-Schwefel-Cluster werden anschließend mit Unterstützung der Proteine Nar1 und Cia1 auf cytosolische und nukleare *apo*-Proteine übertragen. Möglicherweise wird auch ein Teil der Cluster auf das CIA-Protein Dre2 übertragen, dessen Funktion noch unklar ist.

In diesem System ist die Eisen-Quelle für die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese und den Transport in die Mitochondrien im Gegensatz zu den bakteriellen Systemen weitestgehend bekannt, es handelt sich um Frataxin.

1.3 Frataxin und Homologe

1.3.1 Eukaryotisches Frataxin und Friedreich Ataxie

Die wichtigsten Erkenntnisse über Frataxin wurden durch die Krankheit Friedreich-Ataxie gewonnen. „Friedreich-Ataxie ist eine Erbkrankheit, die durch progressive Symptome der Ataxie und Gefühlsverlust charakterisiert ist, was oft zu einer Gehbehinderung und zur Notwendigkeit eines Rollstuhl führt.“ (frei Übersetzt nach: [96]) Neben der Ataxie kommt es bei den Betroffenen zu einer progressiven und zum Teil letalen Kardiomyopathie. In einigen Fällen wird auch Diabetes mellitus mit Friedreich-Ataxie in Verbindung gebracht [96]. Einige der Symptome lassen sich dabei auf die Vergiftung der Zellen mit Eisen zurückführen. In biopsierten Zellen der Betroffenen konnte eine verringerte Aconitase-Aktivität und eine geringere Aktivität andere mitochondrialer Fe/S-Proteine festgestellt werden [96-98].

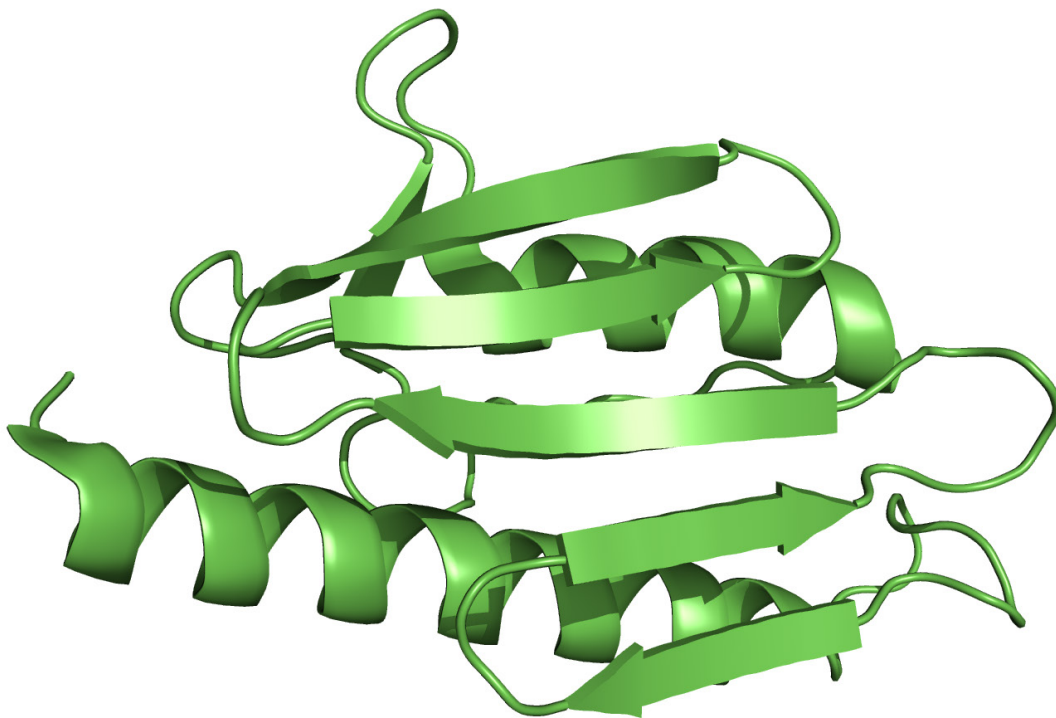


Abbildung 1.20 Kristallstruktur von humanem Frataxin (PDB-Code: 1EKG).

Durch Genome Mapping Untersuchungen von Betroffenen konnte das Fehlen des Proteins Frataxin (Abb. 1.20) als Ursache für Friedreich-Ataxie identifiziert werden. Es handelt sich um ein hochkonserviertes Protein, das bei Menschen, Pflanzen, Fliegen, Würmern und einigen Bakterien zu finden ist. Auch in Hefe findet sich ein entsprechendes homologes Protein Yfh1, weshalb Hefe als eukaryotischer Modellorganismus für Frataxin ausgewählt wurde [99].

Das Protein Frataxin wird zwar von den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert, findet sich jedoch hauptsächlich in den Mitochondrien. Erste Deletionsstudien des Hefe-Frataxins Yfh1 zeigten, dass Frataxin-defiziente Hefezellen zur Eisenakkumulation in den Mitochondrien neigen und die Eisenaufnahmesysteme der Mitochondrien hoch reguliert sind [99]. Wenn Frataxin unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors gebracht wurde, konnten der Phänotyp durch die Regulation von Frataxin reguliert werden. Die Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien konnte auch in menschlichen Zellen von Friedreich-Ataxie Patienten nachgewiesen werden, unter anderem in Herzzellen oder Rückenmarksganglien [96, 100]. Der Grund für die Eisen-Akkumulation und die Hoch-Regulation der Eisenaufnahmesysteme ist bislang nicht völlig geklärt, da das Regulationssystem zur Eisenaufnahme der Hefe keine homologe Entsprechung beim Menschen besitzt, ebenso wie zu einem potentiellen humanen Kandidaten (IRP1) kein homologes Protein in der Hefe vorliegt.

Welchen Einfluss Frataxin auf die Eisenaufnahme der Mitochondrien hat, konnte bisher nicht geklärt werden, aber durch verschiedene Radiolabelling-Experimente und Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass Frataxin mit Nfs1 (der Cysteindesulfurase) und Isu (dem Scaffoldprotein) interagiert und in den Eisen-Transport zu Isu involviert ist, indem es mit den mitochondrialen Transportproteinen Mrs3 und Mrs4 interagiert [101-104]. Möglicherweise fungiert es als Eisen-Donor für die mitochondriale Fe/S-Cluster Biosynthese (Abb. 1.21).

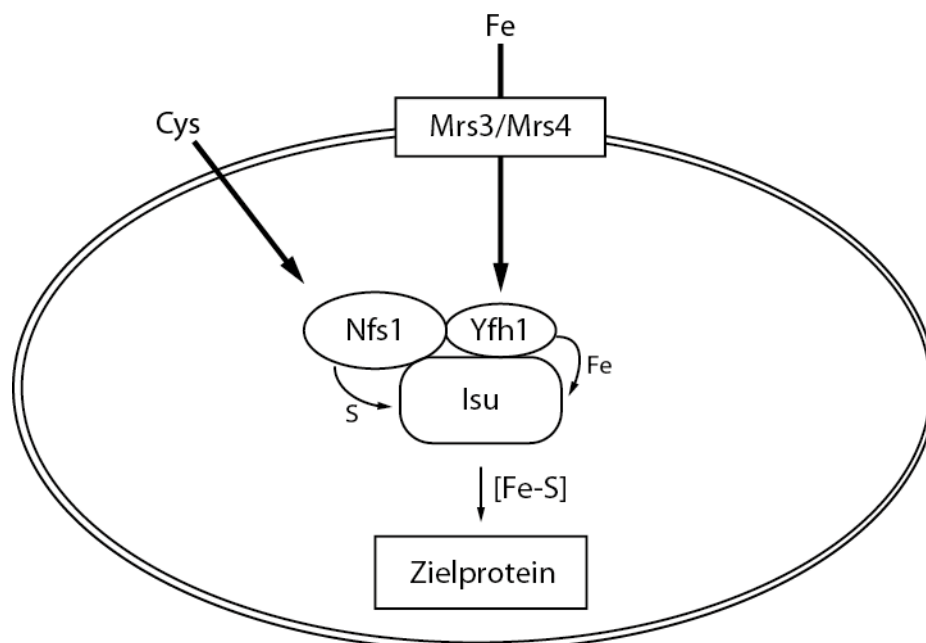


Abbildung 1.21 Vereinfachte Darstellung der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese und der potentiellen Rolle des Frataxins Yfh1.

Neben der potentiellen Funktion als Eisendonator gibt es jedoch auch Hinweise, dass Frataxin gleichzeitig als allosterischer Aktivator der Cysteindesulfurase fungiert. Es scheinen hierbei mehrere Isoformen des Frataxins zu existieren, welche entweder die Rolle des Eisendonors oder des Aktivators übernehmen [105, 106].

1.3.2 Das bakterielle Frataxin-Homologe - CyaY

Wie erwähnt ist Frataxin hochkonserviert durch die Organismenreiche, auch in verschiedenen Bakterien finden sich Homologe, jedoch nicht in allen. Das direkte Sequenzhomologe findet sich unter anderem in *Escherichia coli* (Abb. 1.22), *Salmonella enterica* or *Acidithiobacillus ferrooxidans* und wird als CyaY bezeichnet [107-110]. Es ist jedoch nicht ubiquitär vertreten, in *Bacillus subtilis* existiert z.B. kein sequenzhomologes Protein zu humanem Frataxin. Die Funktion der bakteriellen Frataxinhomologen ist jedoch noch strittig.

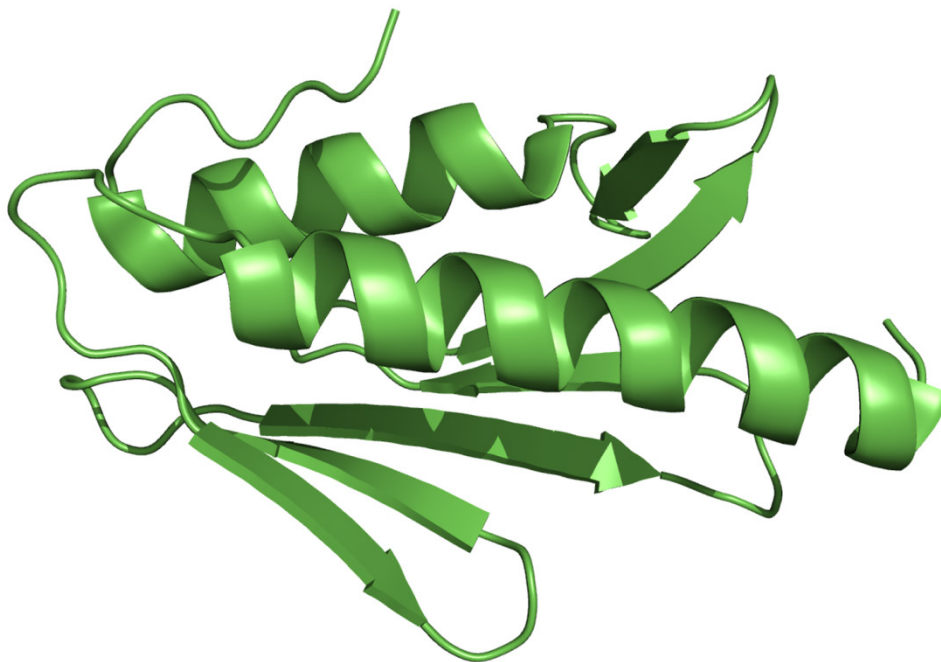


Abbildung 1.22 Kristallstruktur des *E. coli* Frataxinhomologen CyaY (PDB-Code: 1EW4).

1.3.2.1 Physiologischer Einfluss von CyaY

In Eukaryoten ist wie bereits erwähnt bekannt, dass ein Mangel an Frataxin zu einer reduzierten Funktion der Fe/S-Proteine und einer Eisenakkumulation in den Mitochondrien führt. Welchen Einfluss hat das bakterielle Frataxinhomologe CyaY?

Deletionsmutanten in *E. coli* zeigten, dass eine Deletion von CyaY nicht dazu führt, dass die Zellen Eisen in überhöhtem Maße aufnehmen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Eisengehalt der Zellen gefunden, die in LB-Medium kultiviert wurden. Auch konnte keine erhöhte Sensitivität gegenüber H_2O_2 festgestellt werden [109].

Ähnliches wurde für *Salmonella enterica* gefunden. Auch hier zeigte sich, dass der Eisengehalt der Zellen nicht von der Deletion durch Frataxin beeinträchtigt wurde. Allerdings zeigten diese Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber Paraquat, einer quartären Ammoniumverbindung, die in wässriger Lösung radikale bildet und so oxidativen Stress auslöst [110].

In *Salmonella enterica* konnte dabei zusätzlich festgestellt werden, dass die Deletion von CyaY wie auch bei Hefe zu einer verminderten Aktivität von Fe/S-Proteinen führt. In Minimalmedium wurde darüber hinaus die Supplementation von Thiamin erforderlich. In *E. coli* konnte hingegen gezeigt werden, dass in einer CyaY-Deletionsmutante die NADH:Ubichinon oxidoreduktase (Komplex I) vollständig mit allen Fe/S-Clustern synthetisiert, in der Membran verankert wird und normale Aktivität aufweist. Das gleiche gilt auch für die Succinatdehydrogenase. Allerdings ist die Menge dieser Proteine in der Zelle drastisch reduziert. So liegt von Komplex I nur ein Drittel der Menge an Protein im Vergleich zum Wildtyp vor [110, 111].

Die *in vivo* Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass CyaY mit der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese assoziiert ist, jedoch lassen sich noch keine genauen Rückschlüsse auf seine Funktion ziehen.

1.3.2.2 Eisenbindung von CyaY

Frataxin ist wahrscheinlich mit der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese assoziiert, es ist jedoch unklar auf welche Weise. In höheren Eukaryoten deutet sich an, dass es möglicherweise mit dem Eisentransfer in Verbindung steht. Allerdings fehlt Frataxin und seinen Homologen eine entsprechende Kavität oder Bindungstasche für Eisen oder eine passende prosthetische Gruppe wie Häm. Zusätzlich finden sich in den Frataxinhomologen keine konservierten Cysteine oder Histidine, die normalerweise mit der Eisenchelation in Verbindung gebracht werden [112-116]. Es wird vermutet, dass ein mäßig konserviertes Rückgrat aus negativ geladenen Aspartat- und Glutamatseitenketten für die Eisenbindung verantwortlich ist [114-117].

Da Histidine, Cysteine oder eine Kavität fehlen ist die Affinität der Frataxinhomologen zu Eisen auch eher schwach, bestenfalls in einem mikromolaren Bereich [108, 118]. Wenn Frataxin jedoch als Eisentransporter fungiert ist eine geringere Affinität zu Eisen jedoch auch wünschenswert, damit das Eisen auch an die Zielproteine abgegeben werden kann. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Frataxin und seine Homologen sowohl Eisen(II) als auch Eisen(III) binden können. Dabei wurde gefunden, dass Frataxin bis zu 26 Fe^{2+} - oder Fe^{3+} -Ionen binden kann, wobei es vermutlich auch zur Proteinaggregation kommt, die jedoch nicht zur Präzipitation führt. Physiologisch sinnvoll scheint bei *E. coli* Frataxin oder humanem Frataxin eine Bindung von bis zu 6 Fe-Ionen pro Monomer [108, 117, 118]. Eine spezifische, aber schwache Bindung konnte jedoch lediglich für 2 Fe-Ionen pro Monomer nachgewiesen werden (K_D : $\sim 4 \mu\text{M}$) [108]. Vermutlich liegen darüber hinausgehende Bindungen von Metallen als unspezifisch gebundene Polynukleare Spezies vor, die keine physiologische Relevanz besitzen [61].

Unter physiologischen Bedingungen, im Besonderen unter reduzierenden Bedingungen bei Anwesenheit eines Thio-reduktasesystems, zeigte sich, dass CyaY keine hochaggregierten Eisencluster bindet, sondern kein Eisen binden konnte. Unter oxidativen Bedingungen hingegen - in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid - war CyaY in der Lage Eisen mit schwacher Affinität zu binden [61].

1.3.2.3 CyaY und die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese

Es konnte zwar gezeigt werden, dass CyaY unter bestimmten Bedingungen Eisen binden kann, und dass die Deletion Einfluss auf Fe/S-Proteine besitzt, jedoch ist noch unklar auf welche Weise. Da CyaY und seine Eisenbindungseigenschaften scheinbar direkt von der Redoxumgebung abzuhängen scheinen, ist auch eine alternative Rolle in der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese denkbar. Da bereits bei humanem Frataxin gezeigt werden konnte, dass es sich möglicherweise neben der Eisendonor-Aktivität zusätzlich um einen Regulator handelt [106], wurde untersucht, ob Frataxin mit dem Fe/S-Cluster Biosynthesystem interagiert, und welchen Einfluss das Protein besitzt.

Zunächst wurde gefunden, dass CyaY in der Lage ist mit IscS zu interagieren und mit diesem einen 1:1 Komplex zu bilden. Durch NMR- und SAXS-Studien konnte auch gezeigt werden, dass es ebenfalls mit IscU interagiert und in der Lage ist einen CyaY₂-IscS₂-IscU₂ Komplex zu bilden (Abb. 1.23) [119, 120].

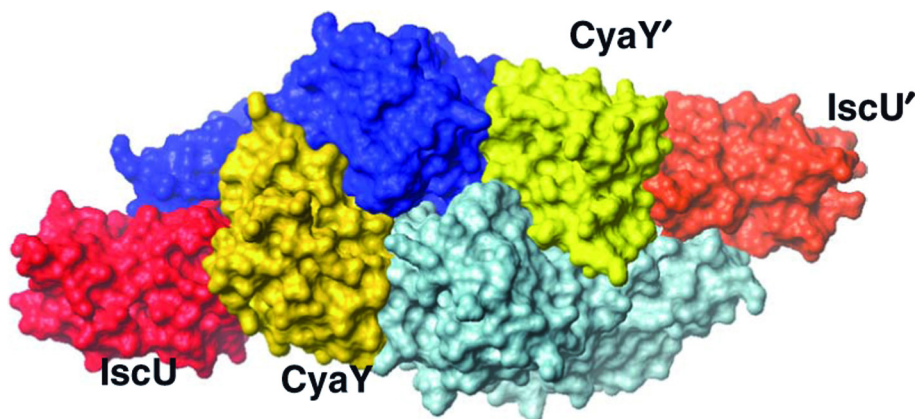


Abbildung 1.23 Repräsentation des CyaY/IscS/IscU-Komplexes ermittelt aus NMR und SAXS-Daten.

Mit weiteren Experimenten wurde anschließend gefunden, dass CyaY mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht als Eisendonor, sondern als Regulator der Fe/S-Cluster Biosynthese fungiert. Während ursprünglich vermutet wurde, dass CyaY einen Einfluss auf die Clusterbildung hatte, und die Bildung der Cluster inhibiert, konnte später gezeigt werden, dass die Bindung von CyaY die Aktivität von IscS beeinflusst und als Inhibitor der Cysteindesulfuraseaktivität fungiert. Die Inhibition ist stärker, wenn IscU ebenfalls präsent ist [119-121].

Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von humanem Frataxin, wo eine Aktivierung gefunden wurde [106], was die Frage aufwirft, ob so hoch-konservierte Proteine, wie Frataxin wirklich ein derart unterschiedliches Verhalten an den Tag legen, oder ob es sich um Unterschiede im *in vitro* Verhalten handelt und *in vivo* ein völlig anderes Verhalten vorliegt.

1.3.3 Das potentielle Frataxin-Homologe YdhG

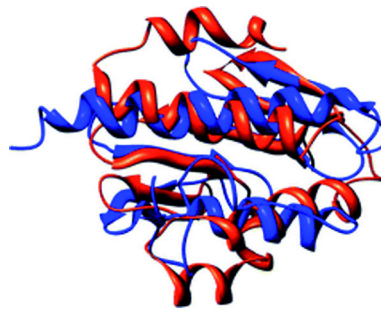


Abbildung 1.24 Struktureller Vergleich von humanem Frataxin (Blau) mit *Bacillus subtilis* YdhG (rot).

Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *B. subtilis* kein direktes sequenzzhomologes Protein zu humanem Frataxin. Qi und Cowan identifizierten über Strukturvergleiche ein strukturell Homologes Protein zu humanem Frataxin: YdhG (Abb. 1.24) [122].

Sie konnten zeigen, dass YdhG bis zu 2 Fe-Ionen pro Monomer binden kann und mit IscU aus *Thermotoga maritima* interagiert. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass YdhG zum Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern auf *T. maritima* IscU verwendet werden kann [122].

Bisher ist der physiologische Einfluss von YdhG jedoch ungeklärt, ein Ziel dieser Arbeit war daher die weitere Untersuchung von YdhG *in vivo* und *in vitro* um den Einfluss von YdhG auf die Eisenhomöostase von *Bacillus subtilis* zu untersuchen und die Funktion von YdhG zu charakterisieren.

1.4 Aufgabenstellung

Die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese in Gram-negativen Organismen, in denen diese auf dem ISC- und SUF-System basiert, ist relativ gut charakterisiert. Da die Homologie dieser Systeme auch in anderen Spezies sehr hoch ist, sind die Ergebnisse sehr gut übertragbar. Auch in Gram-positiven Organismen können Homologe zu diesen Systemen gefunden werden, jedoch zeigen sich dabei Unterschiede im Phylum *Firmicutes*, zu dem auch *Bacillus subtilis* gehört. In diesem Phylum findet sich kein Homologes zum ISC-System, sondern nur ein modifiziertes SUF-System. Des Weiteren verfügt *Bacillus subtilis* nicht über ein CyaY Protein und die intrazelluläre Eisenhomöostase nach Eisenaufnahme ist noch größtenteils unbekannt.

Diese Arbeit sollten daher die in der vorangegangenen Diplomarbeit [123] gewonnen initialen Kenntnisse über die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese von *Bacillus subtilis* erweitern und vertiefen. Es sollten die Kernkomponenten der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese charakterisiert werden. Zunächst sollte durch die Analyse von Deletionsmutanten das essentielle Scaffoldprotein identifiziert werden. Die *in vivo* gewonnenen Erkenntnisse sollten anschließend durch *in vitro* Experimente verifiziert werden und so das Scaffold-Protein umfassend charakterisiert werden.

Neben dem Scaffoldprotein war auch die Cysteindesulfurase und ihre Interaktion mit SufU Gegenstand dieser Arbeit. Untersucht wurde dabei die Interaktion der Cysteindesulfurase mit SufU und verschiedenen Varianten von SufU um die essentiellen Cysteinreste für die Interaktion zu bestimmen und einen möglichen Schwefelübertragungsmechanismus zu erstellen.

Abschließend sollte das potentielle Frataxinhomologe YdhG untersucht werden. Zum einen durch die Generierung einer Deletionsmutante und durch die Untersuchung des rekombinanten Proteins. Dabei sollten sein Einfluss auf den Eisenhaushalt von *Bacillus subtilis* untersucht werden, sowie seine potentielle Interaktion mit SufS und SufU für den Aufbau eines Eisen-Schwefel-Clusters.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
96-well plate Reader	<i>TECAN infinite M200</i>
Autoklav	<i>Tuttnauer 5075 ELV</i> <i>Fedegari Autoclavi SPA FVA3/A1</i>
Analysewaagen	<i>Satorius</i>
Bidestillationsanlage für Wasser	<i>Seral SeralpurPro90CN</i>
Brutschrank	<i>Köttermann 2736</i>
CD-Spektrometer	<i>Jasco J-810 Spectropolarimeter</i>
Clean-Bench	<i>Antair BSK</i>
Dokumentationssystem	<i>Cybertech CS1 Videokamera</i>
Agarosegele	<i>Mitsubishi Video Copy Processor</i> Thermodrucker
Elektrophorese	Agarosegelkammern (hergestellt von Philipps-Universität Marburg)
	<i>Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Gelkammer</i>
Elektroporations-Pulser	<i>Bio-Rad Gene Pulser und Pulse-Controller</i>
ESI-MS System	<i>Hewlett Packard Series 1100</i>
FPLC-Säulen	<i>Amersham Biosciences Ni-NTA Säulen, HiTrap TM</i> <i>Desalting, HiLoad Superdex Gelfiltrationssäule</i>
FPLC-System	<i>Amersham Pharmacia FPLC-System 250:</i> Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500, Uvicord Optische Einheit UV-1 ($\lambda = 280 \text{ nm}$), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, Injektionsventil V-7, 2-Kanal Flachbrettschreiber REC-102, 3-Wege-Magnetventil PSV-100, Fraktionskollektor FRAC-100; <i>Amersham Pharmacia Äkta TM Prime</i> <i>Amersham Pharmacia Äkta Purifier</i>

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
French Press	<i>SLM Aminco</i> French-Pressure Cell Press 5.1
	<i>Thermo Spectronic</i> Standard Cell 40 KP
Glove Box	<i>Coy laboratory products</i> Anaerobic Chamber
Heizschüttler	<i>Eppendorf</i> Thermomixer Comfort
HPLC-System	<i>Agilent series</i> 1100 HPLC-System: Vakuum-Entgaser, DAD-Detektor, Quarternäre Pumpe, Autosampler, Fraktionskollektor, HP-Chemstation
HPLC-System	<i>Agilent series</i> 2100 HPLC system
HPLC-Säulen	<i>Macherey & Nagel</i> CC 250/2 Nucleodur 100-3 C18ec,
ICP-MS	<i>Agilent</i> 7500ce ICP-MS
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series25 Incubator Shaker, Innova4300 Incubator Shaker
	<i>INFORS HT</i> Multitron
Nanodrop	<i>PEQLab</i> ND-1000
PCR-Maschine	<i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal
pH-Meter	<i>Schott</i> CG 840
Pipetten	<i>Eppendorf</i> Research Serie
Photometer	<i>Amersham Biosciences</i> Ultrospec3100Pro <i>Jasco</i> V-550
SpeedVac	<i>Uniequib</i> Univapo 150H
Vakuumgeltrockner	<i>Fisherbrand</i> FSGD-5040
Vortexer	<i>Scientific Industries</i> Vortex Genie2
Wasserschüttler	<i>Infors</i> Aquatron Rundschüttler

2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, die in der folgenden Tabelle nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) in p.A. Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Tabelle 2.2 Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.

Hersteller (Vertriebsort)	Produkte
Amersham Biosciences European GmbH (Freiburg, Deutschland); GE Healthcare	Agar Nr. 1, Ampicillin, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Hefeextrakt, IPTG, Kanamycin
Bachem (Weil am Rhein, Deutschland)	Aminosäuren
Biomol (Ilvesheim, Deutschland)	DTT
Brand (Wertheim, Deutschland)	Einmalküvetten
Difco (Detroit, USA)	Hefeextrakt
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	1.5 mL und 2 mL Reaktionsgefäße
Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)	Oligonucleotide
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	PageRuler unstained Protein Ladder
GATC (Konstanz, Deutschland)	Plasmidsequenzierungen
Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	<i>E. coli</i> Stämme TOP10, BL21
	pTrcHis-TOPO Cloning kit
	pTrcHis2-TOPO Cloning kit
Merck4Biosciences (Nottingham, Großbritannien)	pET28a(+)-Vektor
Millipore (Bedford, USA)	Dialysemembranen (Porengröße 0.025 µm)
	Amicon Ultra Konzentratoren
New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	Restriktionsenzyme
	DNA-Marker
	DNA-Polymerasen
	dNTPs
Oxoid (Cambridge, Oxford)	Agar No. 1, Trypton
Quiagen (Hilden, Deutschland)	Ni ²⁺ -NTA-Agarose

Hersteller (Vertriebsort)	Produkte
Roth (Karlsruhe, Deutschland)	QIAquick Gel Extraction Kit
	QIAquick-spin PCR Purification Kit
	Acrylamid für SDS-PAGE
Sarsted (Nümbrecht, Deutschland)	β-Mercaptoethanol
	Ethidiumbromid
	Pipettenspitzen
	Petrischalen
	Einwegküvetten
Schleicher und Schüll (Dassel, Deutschland)	96-well plates
	PCR-Reaktionsgefäße
	Sterilfilter (0.20 µm und 0.45 µm)
Serva (Heidelberg, Deutschland)	Whatmann-3MM Papier
	Bromphenolblau
Sigma-Aldrich	Triton X-100, Tween 20
	Glycerol, Oligonukleotide, SDS, Aconitase, Isocitrat-Dehydrogenase aus Schweineherz, cis-Aconitat

2.3 Oligonucleotide

Tabelle 2.3 Verwendete Oligonucleotide für Klonierungen und Mutagenese.

Name	Sequenz 5'→3'
AA_sufU_f	ATAGGATCCTCTTTTAATGCAAACCTAGATACATTG
AA_sufU_r	ATACTCGAGTTAATTGCCGCCTTCTTCTTTTCG
AA_csd_TOPO_f	AATATCACAGATATTCGTGAACAGT
AA_csd_TOPO_r	TTAAAAGACATTTGTAAAATACTCC
AA_sufU_c41a_f	ATATGAACAATCCGACAGCCGGCGACCGCATCAG
AA_sufU_c41a_r	CTGATGCGGTCGCCGGCTGTCGGATTGTTTCATAT

Name	Sequenz 5'→3'
AA_sufU_c128a_f	TATCAAAGCTGCAACCCTGTCATGGAAAGCTTTAGAAAAAGGAGTC
AA_sufU_c128a_r	AGGGTAGCTGCTTTGATACGGGCAGGGAATTTTGAAACGC
SufU_Cys66_ala_f	GAAGATGCGAAGTTTGAAGGGGAAGGCGCTTCCATTTCCAT
SufU_Cys66_ala_r	GAAGGCGCTTCCATTTCCATGGCATCCGCTTCGATGA
AA_pX_sufU_f	AAAAC TAGTAGACAAAGGAGTATTTTACAA
AA_pX_sufU_r	AAAGGATCCTTAATTGCCGCCTTCTTCTTT
AA_dsufU_kan_P1	GTCAATGGCTGAGATTATTTTCACAAAAGGCA
AA_dsufU_kan_P2	CATACCTCGGTATAATCTTACCTATCACCTCAATGTATCTAAGTTGCATTAAAAGACAT
AA_dsufU_kan_P3	ATCCGCAACTGTCCATACTCTGATGTTTTAAAGGATTGGAGTGAAAATGGATGGCTAAAA
AA_dsufU_kan_P4	GACGCTTTCTATCGCTCTTGCGG
AA_dsufA_kan_P1	CCTATGAACTCATTTTCGATTTACCAAATG
AA_dsufA_kan_P2	CATACCTCGGTATAATCTTACCTATCACCTCATTATGAACCTCCTTTTAAAAACCGGTTG
AA_dsufA_kan_P3	ATCCGCAACTGTCCATACTCTGATGTTTTAGCACTAAAAACGGA TAGCAACT
AA_dsufA_kan_P4	ATGTGTGGCAATTGGTTTTCC
SufS_notag_topo_f	AATATCACAGATATTCGTGAACAGTTC
SufS_notag_TOPO_r	TTAAAAGACATTTGTAAAATACTCCTTTGTC
ydhG_P1	TTACGGTCCTTACGGTCAAAATTGCTCTTTCCCT
ydhG_P2	CTCTTGCCAGTCACGTTACGTTATTAGTTGTTGTTCCCTCCTAA AATAAAATGATGCCCTCC
ydhG_P3	GCATAGTTAAGCCAGCCCCGACGGAAATGAAGAAAAAGGCATAA CATATGAGCTGTA
ydhG_P4	CACCCGAGATGGCGATTTCAGCGGCAT

Name	Sequenz 5'→3'
ydhG_f_BamHI	AAAGGATCCATGGACGTTTTTTCTGAGTACTTAGCGGGG
ydhG_r_XhoI	AAACTCGAGTCATTTCCGCCAAAAAGTGGAGCAGTCC
AmyE_pXint_front_p1	ATGTTTGCAAAACGATTCAAAACCTCT
AmyE_pX_int_p2	AGGATCCCATTTCCTCCCTTTGATTTTTTA
AmyE_pX_int_p3	TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAA
AmyE_pXint_Back_p4	TCAATGGGGAAGAGAACCGCTTAA
ydhG_pXint_f	AGGATCCCATTTCCTCCCTTTGATTTTTTAATGGACGTTTTTTCTG AGTACTTAGCG
ydhG_pXint_r	ATTTCCGCCAAAAAGTGGAGCAGTTAGAGTCGACCTGCAGGCAT GCAA

2.4 Vektoren

2.4.1 pET28a(+)-Vektor

Der pET28a(+)-Vektor ist ein Expressionsvektor, der zur Überexpression rekombinanter Proteine mit N-terminalem His₆-Tag verwendet wurde, welche über Ni-NTA-Affinitätschromatographie reinigt werden konnten. Die Transkription ist abhängig von der T7-RNA-Polymerase und kann durch IPTG Zugabe induziert werden. Zur Selektion in *E. coli* verfügt der Vektor über eine Kanamycin-Resistenzkassette.

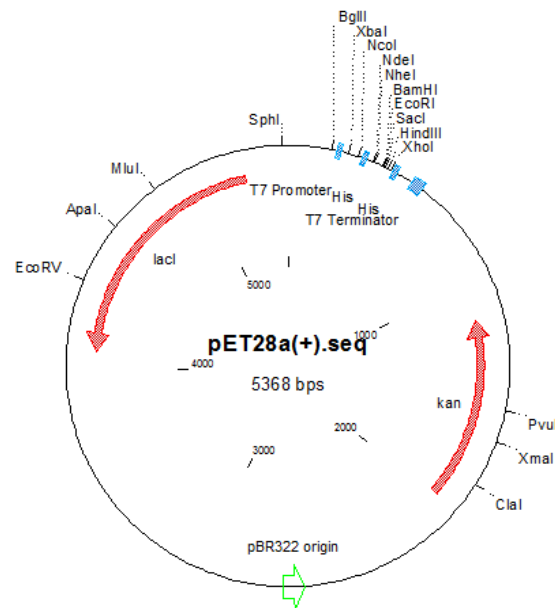


Abbildung 2.1 Vektorkarte des pET28a(+) Vektors.

2.4.2 pTrcHis-TOPO und pTrcHis2-TOPO

Die pTrcHis und pTrcHis2 Vektoren (*Invitrogen*) wurden zur heterologen Expression von Proteinen eingesetzt. Sie erlauben eine einfache Klonierung durch die kovalent gebundene Topoisomerase. Über A-Überhänge können daher PCR-Fragmente direkt in den Vektor kloniert werden.

Beide Vektoren verwenden den *trc*-promotor für die Expression rekombinanter Proteine. Zur Selektion besitzen beide Vektoren das β -Lactamase Gen, welches Ampicillinresistenz vermittelt. Der pTrcHis-TOPO Vektor ermöglicht die Expression rekombinanter Proteine mit N-terminalem His₆-Tag, während der pTrcHis2-TOPO Vektor die Expression rekombinanter Proteine mit C-terminalem His₆-Tag oder ohne Tag ermöglicht.

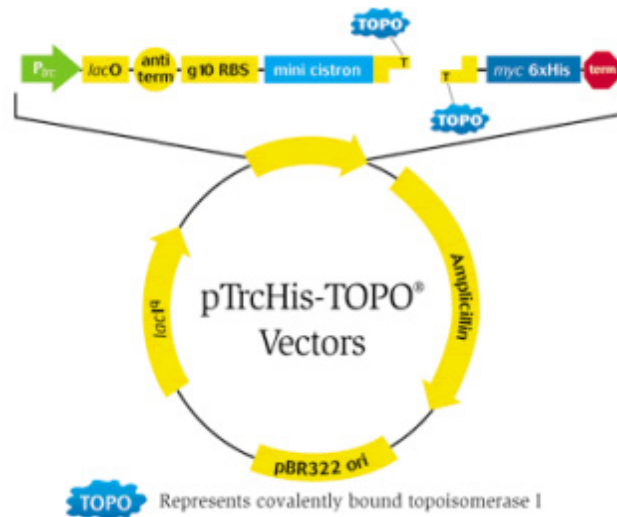


Abbildung 2.2 Vektorkarte des pTrcHis2-Topo Vektors.

2.4.3 pX-Vektor

Der pX-Vektor [124] ist ein *Bacillus subtilis* Integrationsvektor. Er erlaubt die Integration von Genen in die Amy-Site von *B. subtilis*. Die Expression der eingebrachten Gensequenzen kann durch den XylR-Regulator über die Xylose-Konzentration im Medium reguliert werden. Für die Selektion in *Bacillus subtilis* trägt der Vektor eine Chloramphenicolresistenz, für die Klonierung und Selektion in *E. coli* trägt der Vektor eine Ampicillinresistenz.

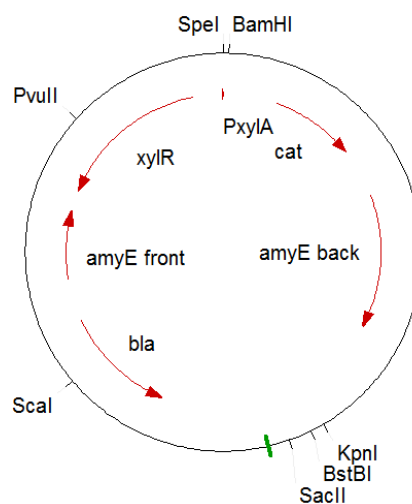


Abbildung 2.3 Vektorkarte des pX-Vektors.

2.4.4 pMUTIN und pDG780

Die Vektoren pMUTIN und pDG780 enthielten Resistenzkassetten für *Bacillus subtilis*, die im Rahmen der Generierung von Deletionsmutanten gegen die *Bacillus subtilis* Gene durch homologe Rekombination ausgetauscht wurden. pMUTIN enthielt eine *mls* Resistenzkassette, während pDG780 eine Kan-Resistenzkassette enthielt.

2.5 Mikroorganismen

2.5.1 *Bacillus subtilis* MR 168

Die chromosomale DNA von *Bacillus subtilis* 168 diente als Basis für alle Klonierungsoperationen. Darüber hinaus wurden einige Deletionsmutanten in diesem Stamm erzeugt. Der Genotyp ist: *trpC2 sfp⁰*.

2.5.2 *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Bei *Bacillus subtilis* ATCC 21332 handelt es sich um den Wildtypstamm. In diesem Stamm ist durch das intakte *sfp*-Gen die Produktion von Sekundärmetaboliten, wie Surfactin oder Bacillibactin möglich. Dieser Stamm wurde für die Generation von Mutanten eingesetzt.

2.5.3 *Bacillus subtilis* Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Mutanten (Tabelle 2.4) generiert, welche auf den *B. subtilis* Stämmen MR168 bzw. ATCC 21332 basieren.

2.4 *Bacillus subtilis* Mutanten, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden.

Name	Basis-Stamm	Genotyp
AA01	MR168	$\Delta sufA::kan$
AA02	MR168	<i>amyE::pX_sufU</i>
AA05	MR168	<i>amyE::pX_sufU</i> , $\Delta sufU::kan$
AA07	ATCC 21332	$\Delta ydhG::mls$
AA08	ATCC 21332	$\Delta ydhG::mls$, <i>amyE::pX_ydhG</i>
AA09	ATCC 21332	<i>amyE::pX_sufU</i>
AA10	ATCC 21332	<i>amyE::pX_sufU</i> , $\Delta sufA::kan$

2.5.4 *Escherichia coli* TOP10

Der Stamm *E. coli* TOP10 wurde zu Klonierungszwecken eingesetzt. Der Genotyp ist: F⁻ *mcrA*. (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*.M15.*lacX*74 *deoR recA1 araD*139. (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*.

2.5.5 *Escherichia coli* BL21(DE3)

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) (Invitrogen) eingesetzt. Der Genotyp dieses Stammes ist F⁻*ompT*[*lon*]*r b⁻ m b⁻*. Durch das Fehlen von Omp-Protease und einem Mangel an Ion Protease wird die Stabilität der exprimierten Proteine deutlich erhöht. Da in diesem Stamm die T7-Polymerase nach LacZ inseriert wurde, kann er für die Expression von Genen unter T7-Promotorkontrolle ohne weitere Helferplasmide eingesetzt werden.

2.6 Kulturmedien

Für die Anzucht der beschriebenen Mikroorganismen wurden die folgenden Kulturmedien verwendet. Zur Kultivierung auf Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren (121 °C, 1.5 bar, 20 min) 1.5 % w/v Agar No. 1 zugesetzt. Antibiotika zur Selektion wurden dem Medium nach dem Autoklavieren in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Für die Selektion von *E. coli*: Ampicillin 50 µg/mL (pTrcHis und pTrcHis2 Vektor) bzw. 100 µg/mL (pX Vektor). Kanamycin 50 µg/mL (pET28a(+)) Vektor).

Für die Selektion von *Bacillus subtilis*: Kanamycin 5 µg/mL, Chloramphenicol 25 µg/mL, Erythromycin 1 µg/mL, Lincomycin 20 µg/mL, Tetracyclin 20 µg/mL.

2.6.1 LB-Medium

LB-Medium wurde als Vollmedium für *Bacillus subtilis* verwendet und zur Anzucht aller *E. coli* Stämme. Das Medium wurde nach dem Ansetzen auf pH 7.0 eingestellt und autoklaviert.

Komponente	Konzentration
NaCl	5 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Bactotrypton	10 g/L

2.6.2 DSM-Medium

Zur Sporulation von *Bacillus subtilis* wurden Difco Sporulations Medium (DSM)-Agarplatten verwendet [125].

Komponente	Konzentration
Nutrient Broth	8 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.12 g/L
KCl	1 g/L
1 M NaOH	0.6 mL/L

2.6.3 Belitsky Minimalmedium

Für das Wachstum von *Bacillus subtilis* unter kontrollierten Bedingungen wurde Belitsky Minimalmedium ohne Citrat (BOC) verwendet [126]. Als Kohlenstoffquelle wurde Glucose oder Fructose verwendet. Durch die Variation der Zusätze, konnten verschiedene Wachstumsbedingungen getestet werden.

20x BOC-Base, pH 7.5

Komponente	Konzentration
(NH ₄)SO ₄	0.3 M
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.16 M
KCl	0.54 M
Tris-HCl	1 M

25x BOC-Zusätze

Komponente	Konzentration
KH ₂ PO ₄	15 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	50 mM
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0.25 mM

1 L Medium setzte sich aus 50 mL BOC-Base und 40 mL BOC-Zusätzen, aufgefüllt auf 1 L mit bd. H₂O zusammen. Nach dem Autoklavieren wurden die folgenden Zusätze zugegeben:

Komponente	Konzentration
Glucose	0 – 0.5 % (w/v)
Fructose	0 – 0.5 % (w/v)
Xylose	0 – 0.5 % (w/v)
Na-Glutamat	4.5 µM
FeCl ₂	0 – 100 µM
Tryptophan ¹	0.005 % (w/v)

¹nur bei *B. subtilis* 168

2.6.4 *Bacillus subtilis* Kompetenzmedium

Die natürliche Kompetenz von *Bacillus subtilis* wurde durch Kultivierung in zwei Medien hervorgerufen. Zunächst wurde eine Übernachtskultur in HS-Medium angeimpft und diese in LS-Medium überführt.

10x S-Base

Komponente	Konzentration
(NH ₄)SO ₄	20 g/L
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	140 g/L
KH ₂ PO ₄	60 g/L
Trinatriumcitrat · 2H ₂ O	10 g/L
1 M MgSO ₄	1 mL/L

10xS-Base wurde nach dem Ansetzen autoklaviert und bei RT gelagert.

HS-Medium

Komponente	Volumen
10x S-Base	10 mL
50% (w/v) Glucose	1 mL
10% (w/v) Hefeextrakt (autoklaviert)	1 mL
2% (w/v) Caseinhydrolysat	1 mL
8% (w/v) Arginin, 0.4% (w/v) Histidin	10 mL
0.5% (w/v) Tryptophan	1 mL
dd H ₂ O	ad 100 mL

HS-Medium wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

LS-Medium

Komponente	Volumen
10x S-Base	2 mL
50% (w/v) Glucose	200 µL
10% (w/v) Hefeextrakt (autoklaviert)	200 µL
50 mM Spermin	200 µL
2% (w/v) Caseinhydrolysat	100 µL
1 M MgCl ₂	50 µL
0.5% (w/v) Tryptophan	200 µL
dd H ₂ O	ad 20 mL

LS-Medium wurde vor Verwendung frisch angesetzt und sterilfiltriert. Tryptophan wurde nur bei der Transformation von *B. subtilis* 168 zugesetzt.

3 Methoden

3.1 Arbeit unter anaeroben Bedingungen

Alle Arbeiten unter anaeroben Bedingungen wurden in einer anaeroben Kammer (Coy Laboratories) unter Formiergas-Atmosphäre (95% N₂/ 5% H₂, O₂ < 1 ppm) durchgeführt. Lösungen wurden durch Durchspülen mit Formiergas über Nacht anaerobisiert. Alle Lösungen und Verbrauchsmaterialien äquilibrierten mindestens 6 h unter anaeroben Bedingungen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Anzucht von *Bacillus subtilis*

Zellkulturen von *Bacillus subtilis* wurden entweder in LB-Medium oder unter kontrollierten Wachstumsbedingungen in BOC-Minimalmedium mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Für Wachstumskurven wurden 50 mL Kultur pelletiert, 2 x mit Zielmedium gewaschen und erneut pelletiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 1 mL Zielmedium aufgenommen und 100 mL des entsprechenden Mediums auf OD₆₀₀ 0.05 inokuliert. Die Zellen wurden dann in einem Luft- oder Wasserschüttler bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

Zur Aufzeichnung von Wachstumskurven wurde in regelmäßigen Abständen (1 h bei Wachstum in BOC-Medium, 30 min in LB) die Zelldichte bei $\lambda=600$ nm (OD₆₀₀) gemessen. Zellproben für andere Messungen und Tests wurden, soweit nicht anders angegeben, bei einer OD₆₀₀ von 0.5 genommen.

3.2.2 Präparation chromosomaler DNA

Zur Präparation von chromosomaler DNA wurden 5 mL *Bacillus subtilis* Übernachtskultur mittels Zentrifugation pelletiert (10 min, 13000 rpm). Die Zellpellets wurden in 1 mL *bd* H₂O gewaschen und anschließend in 500 μ L Lyse-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS) resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden nun säuregewaschene Glasperlen hinzugegeben, bis das Gesamtvolumen 1.25 mL betrug. Durch Vortexieren der Mischung für 2 min wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurde der

Überstand abgetrennt und mit 275 μL Ammoniumacetatlösung versetzt. Die Lösung wurde zunächst 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis für 5 min inkubiert. Dann wurden 500 μL Chloroform hinzugegeben und die Mischung kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde die wässrige Phase in neues Gefäß überführt und die genomische DNA durch Zugabe von 1 mL Isopropanol ausgefällt und durch erneutes Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, bei 56 ° getrocknet und in 50 μL *dd* H₂O aufgenommen. Genomische DNA wurde bei – 20 °C gelagert.

3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden 4 mL LB-Medium mit einer *E. coli* Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C und 250 rpm über Nacht inkubiert. 2 mL der Übernachtskultur wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (13000 rpm, 10 min). Das Zellpellet wurde in 300 μL Puffer P1 (5mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A) resuspendiert und sofort mit 300 μL Puffer P2 (200 mM aq. NaOH, 1 % (w/v) SDS) versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 μL Puffer P3 (2.55 M KOAc, pH 4.8) zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4° C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 μL Isopropanol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 20 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 200 μL 70 % EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Anschließend wurde das Pellet getrocknet (56° C, 15 min) und in 40 μL *bd.* H₂O aufgenommen. Plasmid-DNA wurde bei – 20 °C gelagert.

3.2.4 Konstruktion der Expressionsplasmide

Im Folgenden wird nur ein kurzer Überblick über die generierten Expressionsplasmide und deren Klonierung gegeben, da die verwendeten Techniken etabliert und beschrieben sind [127]. DNA Fragmente wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) aus chromosomaler DNA erzeugt, die verwendete Polymerase war die Phusion HF DNA Polymerase (Finnzymes). Die Fragmente wurden nach den Herstellerangaben mit Phusion HF reaction buffer amplifiziert. DNA-fragmente wurden nach der PCR mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN) nach Herstellervorgaben aufgereinigt. Gereinigte PCR Fragmente und Expressionsvektoren wurden mit Restriktionsendonucleasen nach Herstellerangaben (New England Biolabs) hydrolysiert und durch Agarosegelelektrophorese

von unerwünschten Fragmenten getrennt und aufgereinigt („QIAquick Gel Extraction Kit“, QIAGEN). Nach erfolgter Ligation der Fragmente in den entsprechenden Vektor wurden die Ligationen mit *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Die Plasmide wurden wie oben (3.1.3) beschrieben isoliert und mittels Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung (GATC-Biotech) verifiziert. Anschließend wurden die Plasmide mit *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert.

Zur Generierung von Proteinvarianten wurde der komplette Vektor amplifiziert und durch ortsgerichtete Mutagenese einzelne Basen ausgetauscht. Zur schnelleren Kontrolle der erzeugten Plasmide wurden stille Mutationen eingeführt, welche Restriktionsschnittstellen erzeugten [128].

Konstruktion von pET28a(+)_SufU und pTrcHis_SufS

Die Konstrukte pET28a(+)_SufU (ehemals YurV) und pTrcHis_SufS wurden im Rahmen voriger Arbeiten [123] kloniert und beschrieben. Sie codieren das für die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese benötigte Scaffold-Protein (SufU), bzw. die Cysteindesulfurase (SufS).

Konstruktion von pX_SufU

Das Gen SufU wurde aus der chromosomalen DNA von *Bacillus subtilis* mit den in Tabelle 2.3 angegebenen Primern amplifiziert (444 bp). Das Produkt wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen verdaut und anschließend in den pX Vektor ligiert.

Konstruktion von pET28a_SufU_C41A, pET28a_SufU_C66A , pET28a-SufU_C128A und pET28a_SufU_D43A

Die Konstrukte pET28a_SufU_C41A, pET28a_SufU_C66A, pET28a-SufU_C128 und pET28a-SufU_D43A wurden durch ortsgerichtete Mutagenese des Konstruktes pET28a_SufU erzeugt. Mit den in Tabelle 2.3 beschriebenen Primern wurde die jeweils beschriebene Mutation eingeführt und nach der PCR wurden die Konstrukte mit *E. coli* TOP10 Zellen transformiert.

Konstruktion von pTrcHis2_SufS

Dieses Expressionsplasmid wurde von Hannes Landmann (Philipps-Universität Marburg) kloniert [129]. Es wurden die in Tabelle 2.3 beschriebenen Primer für die PCR aus chromosomaler DNA von *Bacillus subtilis* verwendet. Nach Reinigung des PCR-Produktes wurde es entsprechend der Herstellerangaben direkt in den pTrcHis2-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert.

Konstruktion von pET28a_YdhG

Das *ydhG* Gen wurde aus der chromosomalen DNA von *Bacillus subtilis* amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 zu finden. Nach erfolgreichem Restriktionsverdau wurde das Genfragment (372 bp) in die korrespondierenden Restriktionsschnittstellen des pET28a(+) Vektors ligiert.

Konstruktion von pTrcHis_citB

Auch dieses Expressionsplasmid wurde von Hannes Landmann konstruiert[129]. Das *citB* gen wurde aus der chromosomalen DNA von *Bacillus subtilis* mit den Primern aus Tabelle 2.3 amplifiziert. Das Genfragment (2730 bp) wurde anschließend entsprechend der Angaben des Herstellers in den pTrcHis-TOPO Vektor ligiert.

3.2.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Varianten des SufU-Proteins wurden durch ortsgerichtete Mutagenese, entweder direkt nach dem QuickChange-Protokoll (Stratagene) oder einer modifizierten Version des Protokolls [122] durchgeführt. In beiden Fällen wurde Phusion DNA Polymerase (New England Biolabs) in HF-Puffer mit 2 % DMSO verwendet.

Für das Standard QuickChange-Protokoll wurden komplementäre Oligonucleotide verwendet, die aus etwa 35 Nucleotiden bestanden und die Mutationsstelle in der Mitte enthielten. Bei der modifizierten Version wurden Oligonucleotide verwendet, die einen überlappenden Bereich von etwa 15 Nucleotiden besaßen, in welchem die Mutation zu finden war. zusätzlich wurde bei diesem Protokoll eine weitere stille Mutation eingefügt, welche eine Restriktionsschnittstelle zur Kontrolle einfügte.

Das weitere Verfahren war in beiden Fällen identisch. Nach der PCR wurde das Amplifikat gereinigt und die Templat-DNA mittels *DpnI*-Verdau abgebaut. Dafür wurden 44 µL des Ansatz mit 5 µL NEBuffer 4 und 1 µL *DpnI* versetzt und 2h bei 37 °C inkubiert. 10 µL des Ansatzes wurden anschließend dialysiert und 1 µL mit elektrokompetenten *E. coli* Top10 Zellen transformiert. Die neuen Plasmide wurden wie bereits beschrieben isoliert und auf ihre Identität mittels Restriktionsverdau und durch Sequenzierung (GATC Biotech) überprüft.

3.2.6 Erzeugung von *Bacillus subtilis* Mutanten

Für die Generation von *Bacillus subtilis* Deletionsmutanten wurde die sogenannte PCR-Synthese von Markerkassetten mit langen flankierenden Regionen verwendet [130, 131]. Dafür werden die flankierenden Regionen des Gens mittels PCR amplifiziert, wobei Überhänge zu einer Resistenzkassette (aus pMUTIN oder pDG646) generiert werden. Durch eine anschließende Fusions-PCR werden die flankierenden Regionen des Gens an die Resistenzkassette fusioniert.

Als Alternative zur PCR-Methode wurde der pX-Vektor verwendet, welcher die Integration von Zielgenen unter Kontrolle des Xylose-Promotors erlaubt.

Zur Generierung von Deletionsmutanten wurden zunächst 5 mL LS-Medium (siehe 2.5.4) mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *Bacillus subtilis* Stammes inokuliert. Mit 1 mL der Übernachtskultur wurden anschließend 20 mL frisch hergestelltes und sterilfiltriertes HS-Medium inokuliert und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Bei Erreichen von OD₆₀₀ 0.6 wurden 3 mal 1 mL Kultur in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5, 10 oder 20 µg DNA versetzt und weitere 2 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf LB- oder DSM-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

3.2.7 CAS und 2,2'-Bipyridyl Experimente

Für die Untersuchung des CAS (chrome azurol S) Phänotyps der Kulturen wurden die entsprechenden Zellen über Nacht in LB- oder BOC-Minimalmedium (gegebenenfalls mit Zusatz von Hefeextrakt) angezogen. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (4000 rpm, 4 °C) und 100 µL Kulturüberstand wurden mit 100 µL CAS-Lösung [132] versetzt und für 30 min inkubiert.

Zur Anregung der Bacillibactinproduktion wurden 100 mL LB- oder BOC-Minimalmedium mit entsprechenden Übernachtskulturen zu einer OD_{600} 0.05 inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0.5 angezogen. Bei Erreichen der OD wurden 100 μ M (Endkonzentration) 2,2'-Bipyridyl zugegeben und die Zellen weitere zwei Stunden oder über Nacht wachsen gelassen, bevor sie pelletiert und der Überstand analysiert wurden.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Genexpression

Um die auf den Plasmiden codierten Gene zu exprimieren, wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen verwendet. Es wurden hierfür 2 L-Kulturkolben mit Schikanen mit 500 mL LB-Medium beschickt und mit einer Übernachtskultur 1:00 inokuliert. Dem Medium wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Kanamycin 50 μ g/mL (pET28a(+)-basierte Plasmide) Ampicilin 100 μ g/mL (pTrcHis-basierte Plasmide) bzw. kein Antibiotikum (Expression von SufS). Nach Inokulation wurden die Kulturen bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis zu einer OD_{600} von 0.6. Nach Erreichen der OD_{600} 0.6 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0.1-0.5 mM induziert. Anschließend wurden die Zellen entweder für 4 h bei 37 °C inkubiert oder über Nacht bei 18 °C. Die Kulturen wurden anschließend durch Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, 4 °C) pelletiert und in HEPES A-Puffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 8.0) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in kaltem Wasser aufgetaut und mittels eisgekühlter French-Press (Thermo, Sim Aminco) aufgeschlossen. Die Zellen wurden mindestens dreimal durch die gekühlte French-Press geschleust. Zelltrümmer und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (17000 rpm, 30 min, 4°C) abgetrennt und der klare Überstand des Zentrifugats für die Affinitätschromatographie verwendet.

3.3.3 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der exprimierten Proteine erfolgte durch Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC). Hierfür wurde Ni²⁺-Nitrilotriacetat (NTA)-Superflow (Quiagen) als Säulenmaterial verwendet. Die Säule (Amersham Biosciences) wurde mit dem Material befüllt und die Reinigung erfolgte entweder über eine FPLC-Analage (Amersham Biosciences) oder über ein Äkta Prime, bzw. Äkta Purifier System (Amersham Biosciences).

Die Säule wurde zunächst mit HEPES A äquilibriert (Flussrate 1 mL/min). Danach wurde der filtrierte Überstand mit einer Flussrate von 0.5-1 mL/min aufgetragen und die Säule anschließend mit 5% HEPES B (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0) gewaschen, bis die Absorption A₂₈₀ des Durchflusses eine Basislinie zeigte. Anschließend wurde das Protein mit einem linearen Gradienten (5-50 % HEPES B in 30 min, 50-100% HEPES B in 10 min, bei einer Flussrate von 1 mL/min) eluiert und jeweils 2 mL Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels qualitativem Bradford-Test [133] auf ihren Proteingehalt untersucht und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und mit Hilfe von Amicon Ultra Konzentratoren ankonzentriert und entweder durch Gelfiltrationen oder wiederholte Verdünnung im Konzentrator umgepuffert. Die Proteinlösungen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3.4 Gelfiltrationschromatographie

Analytische Gelfiltrationsexperimente (SEC: size exclusion chromatography) wurden mit einer Superdex 200 5/150 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) durchgeführt. Es wurde ein Äkta Purifier System verwendet. Die Experimente wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina bd. H₂O gewaschen und dann mit drei Säulenvolumina Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, pH 8.0) äquilibriert (Flussrate 0.2 mL /min). Anschließend wurden die Proteinmischungen (100 µL) aufgetragen und die Trennung der Proteine durch Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Zur Kalibration der Säule wurde das High molecular weight und low molecular weight Gel-Filtration Calibration Kit (GE-Healthcare) verwendet.

3.3.5 Native 2D-Proteomanalyse

Die native Proteintrennung wurde von Dr. Marcus Miethke und Hannes Landmann etabliert und durchgeführt. Zunächst wurde *Bacillus subtilis* ATCC 21332 in LB-Medium bei 37 ° und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ 1.5 angezogen. Die Zellen wurden dreimal mit Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.0) gewaschen und anschließend in anaeroben Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mittels French-Press anaerob aufgeschlossen und der Rohextrakt wurde in versiegelten Vials unter anaeroben Bedingungen zentrifugiert um Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile zu entfernen.

Der cytosolische Proteinextrakt wurde anschließend einer Auftrennung in erster Dimension unter anaeroben Bedingungen auf einer metallfreien HPLC Agilent 1200 unterworfen. Hierfür wurde eine TSK-Gel Q-Stat Anionen-Austausch Säule (Tosoh) verwendet. Der Proteinextrakt wurde in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 mit 0.5 mL/min aufgetragen und die Säule mit diesem Puffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm eine Basislinie zeigte. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 0-1 M NH₄Cl im gleichen Puffer über 20 min, wobei 1 mL Fraktionen aufgefangen wurden. Von jeder Fraktion wurden 20 µL für SDS-PAGE verwendet, 400 µL für ICP/MS und weitere 500 µL wurden für die Auftrennung in zweiter Dimension verwendet. Die Trennung in zweiter Dimension wurde mit einer TSK-Gel BioAssist G3SW PEEK Gelfiltrationssäule (Tosoh) durchgeführt, wobei die Fraktionen in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 aufgetragen wurden und bei einer Flussrate von 0.5 mL/min eluiert wurden. Die Elutionsfraktionen wurden ebenfalls der SDS-PAGE- und ICP/MS Analyse unterzogen.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Chemische Eisen-Bestimmung mit Feren

Zur chemischen Bestimmung des Eisengehaltes von Proteinen nach Entsalzung wurde 3-(3-Pyridyl)-5,6-bis(5-sulfo-2-furyl)-1,2,4-triazin (Feren) verwendet.[134] Es handelt sich um einen Chelator, der mit Eisen einen farbigen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda=593$ nm bildet.

Zur Bestimmung des Eisengehalts wurden 100 µL Probe und verschiedene Eisenstandards (je 100 µL) mit 100 µL 1% (w/v) Salzsäure versetzt und kurz gemischt. Alle Mischungen wurden anschließend 10 min bei 80 °C inkubiert und nach Abkühlen kurz zentrifugiert (1 min,

13000 rpm). Anschließend wurden folgende Lösungen zu jeder Probe gegeben und nach jeder Zugabe kurz vortexiert (alle Angaben in w/v):

- 500 μ L 7.5% NH_4OAc
- 100 μ L 4% Ascorbinsäure
- 100 μ L 2.5% SDS
- 100 μ L 1.5% Feren

Nach Zugabe wurden die Proben erneut zentrifugiert und die Absorption bei 593 nm gemessen.

3.4.2 Chemische Sulfidbestimmung

Zur Sulfidbestimmung wurde die von Siegel entwickelte Methode mit *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiamin (DMPD) verwendet [135]. DMPD verbindet sich mit dem freien Sulfid und bildet quantitativ Methylenblau, welches ein Absorptionsmaximum von 650 nm besitzt.

Zur Bestimmung des Sulfidgehalts wurden Proteinproben und verschiedene Sulfidstandards auf 200 μ L Volumen mit *bd.* H_2O verdünnt. Zu diesen Lösungen wurden nun jeweils 600 μ L 1% (w/v) Zinkacetat-Lösung gegeben sowie weitere 50 μ L 7% (w/v) NaOH-Lösung. Die Reaktionsgefäße wurden nun 15 min bei RT inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert.

Nun wurde vorsichtig und langsam das Pellet aufgelöst, indem 150 μ L 0.1% DPMD in 5 M HCl und anschließend schnell weitere 150 μ L einer 10 mM FeCl_3 -Lösung in 1 M HCl zugegeben wurden. Die Gefäße wurden sofort geschlossen und für 30 s vortexiert. Anschließend wurden die Proben 20 min inkubiert und dann zentrifugiert (13000 rpm, 5 min) und die Absorption bei 670 nm gemessen.

Für die Bestimmung von Sulfid in Cysteinesulfuraseassays wurden zu den jeweils 800 μ L Reaktionsansatz direkt 100 μ L DMPD und 100 μ L FeCl_3 gegeben und gemischt. Die Ansätze wurden ebenfalls 20 min im Dunkeln inkubiert und die Absorption gemessen.

3.4.3 Peptidmassen-Fingerabdruck

Die Identität der rekombinanten Proteine, sowie die Zusammensetzung der durch 2D-Proteomanalyse erhaltenen Fraktionen, wurde mittels Peptidmassen-Fingerabdruck bestätigt bzw. analysiert. Hierfür wurde entweder eine SDS-PAGE Gelbande, respektive ein Teil der Fraktion tryptisch verdaut und durch die Routineanalytik des Fachbereichs Chemie unter Leitung von Dr. Uwe Linne mit einem Nano-Spray-HPLC-QTOF-MS-Gerät untersucht. Die Proteine wurden anschließend durch Vergleich des Peptid-Massenfingerabdrucks mit der MASCOT Datenbank identifiziert.

3.4.4 ICP/MS

ICP-MS Messungen wurden von Prof. Dr. Andreas Seubert und David Nette durchgeführt. Die Proben für die ICP/MS-Analytik wurden mit hochreiner Salpetersäure behandelt um alle Komponenten mit hohem Molekulargewicht zu zerstören und um den Lösungseigenschaften der Kalibrierstandards zu entsprechen. Alle Lösungen wurden gravimetrisch mit Reinstwasser verdünnt und allen Proben wurde Yttrium als interner Standard zugesetzt. Mit einem Agilent 7500ce ICP-MS wurde anschließend eine quantitative Analyse des Gehalts an Mn, Fe, Co, Ni, Cu und Zn der Proben vorgenommen. Zur Kalibration wurden verschiedene Standards (Merck 111355 ICP multi-element standard solution IV) verwendet.

Im Falle getrockneter Bakterienzellen wurden diese quantitativ durch Aufkochen in hochreiner Salpetersäure gelöst und nach Verdünnung mit Reinstwasser wie beschrieben behandelt.

3.4.5 HPLC-MS

Zur Untersuchung des Kulturüberstandes von in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten wurde Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (*high performance liquid chromatography mass spectrometry* HPLC-MS) verwendet. Es wurde hierfür die so genannte reversed-phase (RP) Chromatographie angewendet, bei der die Substanzen mit einer nicht-polaren stationären Phase wechselwirken. Hierfür wurde ein Agilent 1100 HPLC-System verwendet. Zur Detektion der Retentionszeiten wurde UV/Vis-Detektion verwendet, um zur Analyse der Peaks ein „Single-Quadrupol-Elektrospray-Ionization“ Massendetektor.

Zur Untersuchung auf Bacillibactin im Kulturüberstand wurden auf eine 125/2 Nucleodur 100-3 C18-Säule (Macherey-Nagel) 100 µL Überstand aufgetragen und mit einer Flussrate von 0.3 mL/min, Säulentemperatur 45 °C, und einem linearen Gradienten von 10 bis 95% Wasser/Acetonitril mit 0.05% Ameisensäure, über 20 min eluiert. Massenspektren der eluierten Komponenten wurden im Positiv-Modus mit einer Massenbreite von 100 – 1000 m/z gemessen. Zur Identifikation von Bacillibactin wurde die UV Absorption bei 215 nm gemessen.

3.4.6 In-Gel Proteinquantifizierung

Die In-Gel Proteinquantifizierung wurde von Dr. Marcus Miethke und Hannes Landmann mit SyproRuby durchgeführt. Hierfür wurden Aliquots der Separation auf denaturierende SDS-Gele aufgetragen und der Gelektrophorese bei konstanten 150 mV unterworfen. Die Gele wurden für 10 min fixiert (7.5 % Essigsäure, 10 % EtOH) und anschließend für mindestens 12 h gefärbt. Nach der Färbung wurden die Gele zweimal gewaschen (7.5 % Essigsäure, 10 % EtOH), bevor sie unter UV-Licht ausgewertet wurden.

Zur Kalibration wurden Gele mit verschiedenen BSA Konzentrationen (5-500 ng) beladen und wie oben beschrieben entwickelt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit der Software ImageJ 1.43 (NIH) ausgewertet und quantifiziert. Die einzelnen Proteinbanden einer Elutionsfraktion wurden anschließend ausgeschnitten und einem tryptischem Verdau und Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse unterzogen.

3.5 Spektroskopische Methoden

3.5.1 UV/VIS-Spektroskopie

UV/Vis-Spektroskopische Messungen wurden entweder an einem Jasco V-550 Spectrometer oder an einem Amersham Biosciences Ultrospec 3100 pro Spektrometer vorgenommen. Alle Messungen wurden unter aeroben Bedingungen gemessen, anaerobe Proben wurden in verschlossenen Küvetten unter Luftausschluss gemessen.

3.5.2 CD-Spektroskopie

Schmelzkurven von Proteinen wurden mit einem Jasco J-810-Spektropolarimeter aufgenommen. Es wurden Küvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet. Gemessen wurde bei einer konstanten Wellenlänge von 222 nm mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Dämpfung

von 1 s und einer Auflösung von 0.2 °C. Es wurde ein Temperaturbereich von 5-95 °C beobachtet, bei einer Temperatursteigerung von 1 °C/min. Die Proteinkonzentration betrug 2.5 µM Protein in 2.5 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0.

3.5.3 EPR-Spektroskopie

Die EPR-Spektren der Spintrapping-Experimente wurden von Dr. Olaf Burghaus am Fachbereich Chemie gemessen. Es wurde ein Bruker ESP 300E Spektrometer mit einer modifizierten Varian X-Banc Cavity verwendet. Die Messung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt mit einer Mikrowellenleistung von 20 mW, einer Modulationsamplitude von 50 µT bei 100 kHz und einer Mikrowellenfrequenz von 9.51 GHz.

Für die Experimente wurden die entsprechenden *B. subtilis* Zellen in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 angezogen. Nach Erreichen der OD wurden 200 µL Kultur mit 200 µL 5 µM DMPO (5,5-Dimethyl-pyrrolin-N-oxid) versetzt und sofort vermessen.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Eisen-Schwefel-Cluster Rekonstitution

Die Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden 50 µM SufU für 1 h mit 5 mM DTT in Rekonstitutionspuffer (25 mM Tris/HCl, 100 mM NaOH, pH 8.0) inkubiert um SufU zu reduzieren. Anschließend wurden FeCl₃ oder Ammonium-Eisen(III)-Citrat in 1-5fachen Überschuss zugegeben und für 10 min inkubiert, bis die Farbe der Lösung sich nicht mehr veränderte. Anschließend wurden eine dem Fe äquivalente Stoffmenge Li₂S langsam zugegeben und die Mischung 15 min inkubiert, bevor ungebundenes Eisen und Sulfid mittels Gelfiltrationschromatographie über PD-10 Säule entfernt wurde. Der Clusteraufbau Fällung mittels UV/VIS-Spektroskopie detektiert.

Rekonstitutionen mit SufS wurden wie oben beschrieben durchgeführt mit Ausnahme, dass neben 50 µM SufU 0.5 µM SufS in der Mischung präsent waren und anstelle von Li₂S 2.5 mM Cystein zugegeben wurden und die Inkubationszeit auf 30 min verlängert wurde.

Rekonstitutionen mit SufS und YdhG wurden wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch wurde anstelle von Ammonium-Eisen(III)-Citrat 400 µM eisenbeladenes YdhG (3.6.2) eingesetzt. Die Inkubationszeit wurde hierbei auf 2 h verlängert.

3.6.2 Eisenbeladung von YdhG

Für die Beladung von YdhG mit Eisen wurden 100 – 500 μM *apo*-YdhG zunächst 1 h unter anaeroben Bedingungen in Rekonstitutionspuffer mit DTT reduziert. Anschließend wurde ein 5-facher Überschuss an verschiedenen Eisensalzen (Ammonium-Eisen(III)-citrat, FeCl_2 , $\text{Fe}(\text{DHB})_3$) in Rekonstitutionspuffer zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde überschüssiges Eisen durch Gelfiltration über eine PD-10-Säule entfernt und die Proteinfractionen mit qualitativem Bradfordassay identifiziert. Der Eisengehalt des Proteins wurde entweder mittels ICP-MS oder Feren bestimmt.

Das beladene YdhG wurde anschließend für weitere Assays verwendet. YdhG wurde immer frisch mit Eisen beladen und nur in der *apo*-Form gelagert.

3.6.3 Cysteindesulfuraseassays

Die Cysteindesulfuraseaktivität wurde durch Messung des freigesetzten Sulfids (3.4.2) bestimmt. In einem Standardassay wurden 0.5 μM SufS verwendet, welches mit verschiedenen Konzentrationen SufU (0-20 μM) in Desulfurasepuffer 15 min bei 37 °C inkubiert wurde, bevor die Reaktion durch Zugabe von Cystein (0.5 μM – 5 mM) gestartet wurde. Das Reaktionvolumen betrug 800 μL . Die Reaktion wurde durch die Zugabe von DMPD und FeCl_3 (siehe 3.4.2) gestoppt und der Sulfidgehalt analysiert. Die Assays wurden bei 37 °C durchgeführt und die Reaktionsdauer war für kinetische Experimente jeweils 1 min.

Für Inhibitionsexperimente wurden zusätzlich SufU Varianten in verschiedenen Konzentrationen zugeben. Die Daten wurden mit Origin 7.0 (Origin Software) ausgewertet und mittels nicht linearen Fits analysiert. Die Inhibitionsauswertung auf Basis des Massenwirkungsgesetzes wurde von Dr. Marcus Miethke mit KaleidaGraph Software durchgeführt.

3.6.4 Clustertransfer-Assays

3.6.4.1 Clustertransfer auf das Hefeprotein Leu1

25 μM *apo*-Leu1 (Isopropylmalat-Isomerase) wurde mit 5 mM DTT unter anaeroben Bedingungen für 1 h reduziert, bevor der Assay durchgeführt wurde. Die finalen Assays enthielten: 2.45 μM Leu1 und 5 mM DTT in Tris-Puffer (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl,

pH 8.0) in einem Gesamtvolumen von 250 oder 500 μL . Die Konzentration von rekonstituiertem SufU wurde ermittelt und *holo*-SufU in einem molaren 2:1-Verhältnis zu Leu1 gegeben um den Transfer zu starten. 10 μL Aliquots der Assay-Mischung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und auf die Fähigkeit getestet (2*R*,3*S*)-Isopropylmalat zu Dimethylcitrat ($\epsilon_{235} = 4.35 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) zu konvertieren [136]. Die Reaktion wurde photometrisch verfolgt.

3.6.4.2 Clustertransfer auf *Bacillus subtilis* Aconitase CitB

Zur Verfolgung des Clustertransfers auf *Bacillus subtilis* CitB wurde die Rekonstitution des Clusters mit SufS und Cystein als Sulfidquelle, sowie mit YdhG als Eisenquelle wie oben beschrieben für 2 h durchgeführt.

Nach der Rekonstitution wurden von der Reaktionsmischung 50 μL mit 20 μM SufU mit 25 μL 10 μM CitB in Rekonstitutionspuffer gemischt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Aconitaseaktivität bestimmt. Als Kontrollen wurden der Eisen- und Sulfidgehalt der Rekonstitutionsmischung bestimmt und eine chemische Rekonstitution mit entsprechenden Konzentrationen durchgeführt und eine Kontrolle mit eisenbeladenem YdhG und der gleichen Sulfidmenge zur Rekonstitution der Aconitase.

3.6.5 Aconitase-Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der Aconitaseaktivität wurde ein gekoppelter Assay verwendet, bei dem cis-Aconitat durch die Aconitase zu Isocitrat umgewandelt wird, welches von Isocitratdehydrogenase (IDH) (aus dem Schweineherz, *Sigma*) unter NADP-Verbrauch zu α -Ketoglutarat umwandelt [137-139].

Um die Aktivität der Aconitase in den Zellen zu testen, wurden diese in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0.4 angezogen. 50 mL Zellkultur wurden pelletiert und in 1 mL Puffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (13000 rpm, 4 °C) und das klare Zelllysate für die Aktivitätsmessungen verwendet.

Die Messungen wurden im Mikromaßstab in 96-well-plates durchgeführt, zum Messen wurde ein TECAN Infinite M200 96-well-plate reader verwendet. Das Gesamtvolumen der Assays betrug 100 μL . Für den Assay wurden zu 0.2 mM cis-Aconitat, 0.4 U/mL IDH und 1 mM

NADP in Puffer (100 mM Triethanolamin, 1.5 mM MgCl_2 , 0.1% Triton X-100, pH 8.0) insgesamt $\sim 10 \mu\text{g}$ Rohextraktprotein gegeben. Die Aktivität wurde durch Messung der Absorption von konvertiertem NADPH bei 340 nm bestimmt.

Analysen in größerem Maßstab, wie nach dem Clustertransfer, wurden analog in einem Gesamtvolumen von 750 μL durchgeführt, wobei 0.5 μL gereinigte, rekonstituierte Aconitase anstelle des Zelllysats verwendet wurden.

3.6.6 Succinat-Dehydrogenase Aktivitätsassay

Für Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität wurde der künstliche Elektronenakzeptor Dichlorophenol-Indophenol (DCPIP) verwendet [140]. Die Zellen wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0.4 angezogen, 50 mL Kultur wurden pelletiert und in 1 mL Puffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und das gesamte Zelllysats inklusive der Membranfraktionen wurde verwendet.

Die Messungen wurden analog zu den Aconitase-Aktivitätsmessungen im Mikromaßstab durchgeführt und in 96-well-plates durch ein TECAN Infinite M200 96-well-plate Lesegerät ausgelesen. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 100 μL . Für den Assay wurden in eine Lösung aus 0.25 % (w/v) Succinat, 0.1 mM EDTA, 1 mM KCN, 70 μM DCPIP, 0.1% (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 in bd. H_2O $\sim 10 \mu\text{g}$ Proteinrohextrakt gegeben und die Absorptionsänderung bei 600 nm gemessen. Die Spezifität der Reaktion wurde durch Zugabe von Malonat (0,25 % (w/v)) als Inhibitor überprüft.

3.6.7 Malat-Dehydrogenase Aktivitätsassay

Die Aktivität der Malat-Dehydrogenase wurde über den NADH-Verbrauch bei der Konvertierung von Oxalacetat zu Malat gemessen [141]. Die Zellen wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0.4 angezogen, 50 mL Kultur wurden pelletiert und in 1 mL Puffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer und unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (13000 rpm, 4°C) abgetrennt.

Die Messungen wurden im Mikromaßstab in 96-well-plates durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Assays betrug 100 μL . $\sim 10 \mu\text{g}$ Proteinrohextrakt wurden zu 0.1 mg/mL

NADH und 0.05 mg/mL Oxalacetat in Puffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaOH, pH 7.4) gegeben und die Absorption bei 340 nm wurde gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung und Charakterisierung des Scaffoldproteins

4.1.1 Bioinformatische Identifizierung des potentiellen Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthesesystems

Die bioinformatischen Untersuchungen zur Identifizierung des Scaffoldproteins wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt [123]. Eine minimale Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthesemaschinerie benötigt zwei Komponenten: Eine Cysteindesulfurase um Sulfid zur Verfügung zu stellen, sowie ein Scaffoldprotein, auf dem der Cluster assembliert wird. Die entsprechenden Systeme in anderen Organismen wurden bereits charakterisiert und dienten als Basis für eine BLAST-Suche nach Homologen im Genom von *Bacillus subtilis* [142]. Als Basis wurden die Proteinsequenzen der *Escherichia coli* ISC und SUF Systeme verwendet. Dabei wurden ein Gencluster und ein weiteres potentielles Scaffoldprotein identifiziert.

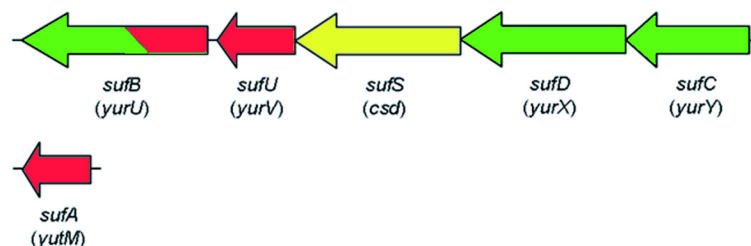


Abbildung 4.1 Identifizierter Gencluster aus *Bacillus subtilis*, sowie das einzelne potentielle Scaffold SufA. (grün: Energieerzeugend/Chaperon, rot: Scaffold, gelb: Cysteindesulfurase).

Der identifizierte Gencluster ist größtenteils homolog zum Suf-System aus *E. coli*, daher wurden die Gene *yurYX-csd-yurVU* analog zum Suf-System aus *E. coli* in *sufCDSUB* umbenannt (Abb. 4.1). In dem Gencluster finden sich: das potentielle Scaffold SufU (*yurV*, rot), die Cysteindesulfurase SufS (*csd*, gelb) und das potentiell energieerzeugende Chaperonsystem SufBCD (*yurU*, *yurXY*, grün/rot), wobei SufB als potentiell weiteres Scaffold in Betracht kommt, während SufC eine ATP-Bindungsstelle besitzt. Die wesentlichen Unterschiede zum *E. coli* Suf-System sind das fehlende SufE-Protein, welches in *E. coli* die Cysteindesulfurase aktiviert und für den Schwefeltransfer zuständig ist, sowie, dass sich anstelle des A-Typ Scaffolds SufA, sich in diesem System analog zu ISC- oder NIF-Systemen ein U-Typ Scaffold SufU befindet. Im Gegensatz zu *E. coli* findet man in *Bacillus subtilis* keinen zum ISC-System homologen Gencluster. Dies deutet daraufhin, dass das Suf-

System das einzige vegetative System in *Bacillus subtilis* darstellt oder ein weiteres noch unbekanntes System vorhanden ist.

Neben dem identifizierten Gencluster beinhaltet das Genom von *Bacillus subtilis* jedoch auch ein potentiell A-Typ Scaffold, yutM, dass eine niedrige, aber signifikante Homologie zu *E. coli* SufA besitzt. Die Homologie von SufU zu IscU ist ebenfalls sehr hoch, zeigt jedoch einige Unterschiede zu IscU, wie der multiple Sequenzvergleich in Abb. 4.2 zeigt.

ISU1_YEAST	1	MLPVITRFARPALMAIRPVNAMGVLASSITKRLVHPKVIHYTHERNVGSGLDKLIPNVG
NIFU_HAEIN	1	-----MAYSEKVIDHYENPRNVGSGLDKLIPNVG
ISCU_ECOLI	1	-----MAYSEKVIDHYENPRNVGSGLDKLIPNVG
ISCU_AZOVI	1	-----MAYSUKVIDHYENPRNVGSGLDKLIPNVG
NIFU_ARATH	1	---MLKQAAKKAL---GLTSRQSTPWSVSIFRTVHEHVIDHYENPRNVGSGLDKLIPNVG
SUFU_BACSU	1	-----MSFNANLDTLYRQVIMDHYKIPRNGKGVN---LSITVV
ISU1_YEAST	61	TGVVGAPACGDVMLQIKVNDSTGHIIDVFKFTGCGSAIASSSYTELVCQMLDEA--
NIFU_HAEIN	29	TGMVGAPACGDVMLQIKVDENGLIEDAKFKTYGCGSAIASSSLTEWVKGKLEEA--
ISCU_ECOLI	29	TGMVGAPACGDVMLQIKVNDGLIEDAKFKTYGCGSAIASSSLTEWVKGKLEEA--
ISCU_AZOVI	29	TGMVGAPACGDVMLQIKVNDGLIEDAKFKTYGCGSAIASSSLTEWVKGKLEEA--
NIFU_ARATH	54	TGVVGAPACGDVMLQIKVDKTKQIVDAFKFTGCGSAIASSSLTEWVKGKLEEA--
SUFU_BACSU	35	D--NNETCEDRIRITKDGDDGLIEDAKFEGEGCSISASASMTQAIRGKQDETALS
ISU1_YEAST	119	-----AKIKNTEIAKELSLPPVKIHCSLAEDAIAKAAIKDYKSKRNTP
NIFU_HAEIN	86	-----GAIKNSQIAEELSLPPVKIHCSLAEDAIAKAAIDYKAKQG--
ISCU_ECOLI	86	-----QAIKNTIAEELSLPPVKIHCSLAEDAIAKAAIDYKSKREA-
ISCU_AZOVI	86	-----ETIKNTQIAEELSLPPVKIHCSLAEDAIAKAAIDYKHKGL-
NIFU_ARATH	112	-----LTIKNTEIAKHLSPVPVKIHCSLAEDAIAKAAIKDYKSKRVKT
SUFU_BACSU	91	MSKIFSDMYQGKEYDGSIDGDIHALQGSKFEATIKCATSWKAEKAKEEGG----
ISU1_YEAST	162	TML-----S
NIFU_HAEIN		-----
ISCU_ECOLI	128	-----K
ISCU_AZOVI	128	-----V
NIFU_ARATH	155	NGAAAAGETTQA
SUFU_BACSU	147	-----N

Abbildung 4.2 Multipler Sequenzvergleich von *Bacillus subtilis* SufU mit den homologen Proteinen ISU1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST), NifU aus *Haemophilus influenzae* (HAEIN), IscU aus *Escherichia coli* (ECOLI), NifU aus *Arabidopsis thaliana* (ARATH) und IscU aus *Azotobacter vinelandii* (AZOVI). Die konservierten Cysteinreste, die für den Clusteraufbau erforderlich sind, sind gelb markiert, die LPPVK Sequenz, an welche HscAB bindet, ist rot markiert und eine 19 aa Insertion in SufU in grün markiert.

Sowohl SufU als auch IscU besitzen drei hochkonservierte Cysteinreste, die in Gelb markiert sind. SufU fehlt im Gegensatz zu IscU eine konservierte LPPVK Sequenz (Rot), an welche der HscAB Chaperonkomplex bindet. Allerdings weist SufU eine 19 Aminosäuren Insertion (grün) vor dem dritten konservierten Cysteinrest auf, wodurch sich SufU deutlich von IscU oder NifU unterscheidet.

4.1.2 Untersuchung der physiologischen Relevanz der putativen Scaffoldproteine

4.1.2.1 Generierung von *B. subtilis* Δ sufU- und Δ yutM-Mutanten

Die Identifizierung des Hauptscaffolds sollte mit Hilfe von Deletionsmutanten in *Bacillus subtilis* 168 erfolgen. Die Generierung der Deletionsmutanten erfolgte wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Während der Austausch des Gens *yutM* gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette direkt möglich war und so die Mutante AA01 erzeugt wurde, konnte *sufU* (*yurV*) nicht durch direkte Deletion gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht werden, was mit der Literatur, welche SufU als essentielles Gen markiert, übereinstimmt.[143] Daher wurde zunächst das *sufU*-Gen in den pX-Vektor kloniert, welcher das Gen unter Kontrolle des Xylosepromotors in die *amyE*-site von *Bacillus subtilis* integrierte. Nach erfolgreicher Generierung der entsprechenden Mutante AA02, wurde anschließend das Gen *sufU* an seiner Genomposition gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht und die Mutante AA03 erzeugt. Die erfolgreiche Generierung aller Mutanten wurde durch PCR des betreffenden Abschnitts der chromosomalen DNA überprüft.

4.1.2.2 Wachstumsanalyse der Δ yutM- und Δ sufU-Mutante

Um das tatsächliche Scaffoldprotein und den Einfluss von SufU und YutM auf den Stoffwechsel von *Bacillus subtilis* zu analysieren, wurden verschiedene Wachstumsexperimente durchgeführt. Eine erste Feststellung war, dass die Δ sufU Mutante AA03 auch in Vollmedium ohne Xylose-Supplementation ein verringertes Wachstum zeigte, wohingegen die Δ yutM Mutante AA01 keinen Wachstumsphänotyp zeigte. Für weitere Analysen wurden Wachstumsexperimente in BOC-Minimalmedium durchgeführt, wobei das Wachstum der Mutante jeweils mit dem Wachstum des Wildtyps verglichen wurde.

Da der Xyloseregulator durch Glucose reprimiert wird und Glucose gleichzeitig die Aufnahme von Xylose inhibiert, wurde Fructose als Kohlenstoffquelle verwendet und verschiedene Xylosekonzentrationen zugegeben, um den Einfluss der Expressionsrate von SufU auf das Zellwachstum zu beobachten. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Wachstum direkt von der Xylosekonzentration und damit von der SufU-Expressionsrate abhängig ist. Ohne Xylosezugabe ist das Wachstum der Mutante stark verringert (Abbildung 4.3).

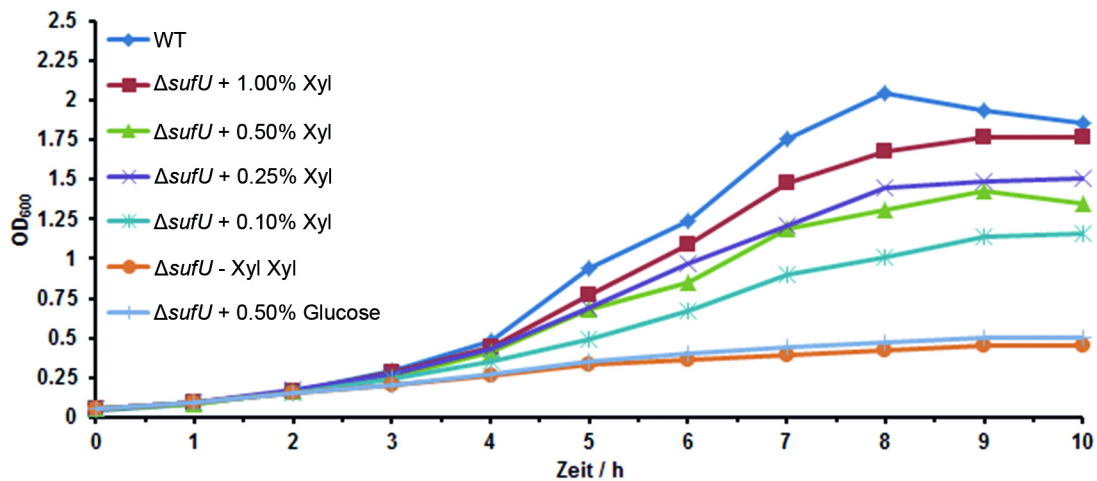


Abbildung 4.3 Wachstum von AA03 und *Bacillus subtilis* 168 in BOC-Minimalmedium mit Fructose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Xylosekonzentrationen.

Die ΔyutM Mutante zeigt in BOC-Minimalmedium keinen Wachstumsphänotyp (Abb. 4.4). Dies deutet darauf hin, dass YutM unter den getesteten Bedingungen keine unmittelbare Relevanz für *Bacillus subtilis* besitzt.

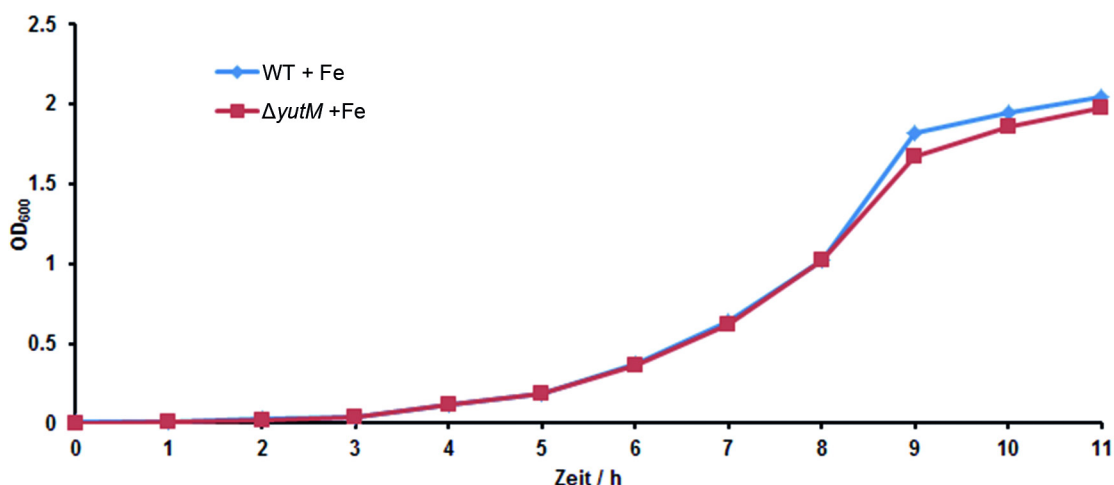


Abbildung 4.4 Wachstum der ΔyutM Mutante in BOC-Minimalmedium bei Zugabe von Eisen.

Da berichtet wurde, dass SufA für die Beladung von [4Fe-4S]-Proteinen wie Endonuclease III oder Aconitase B zuständig ist [41], wurde getestet, wie sich die $\Delta yutM$ - Mutante in Minimalmedium ohne Glutamat verhält. Unter diesen Bedingungen muss Glutamat aus α -Ketoglutarat gewonnen werden. α -Ketoglutarat wird durch die Isocitratdehydrogenase aus Isocitrat generiert, welches durch Aconitase erzeugt wird. Darüber hinaus wurde getestet, ob Eisenmangelbedingungen einen Einfluss auf das Wachstum der Mutante AA01 haben (Abb. 4.5).

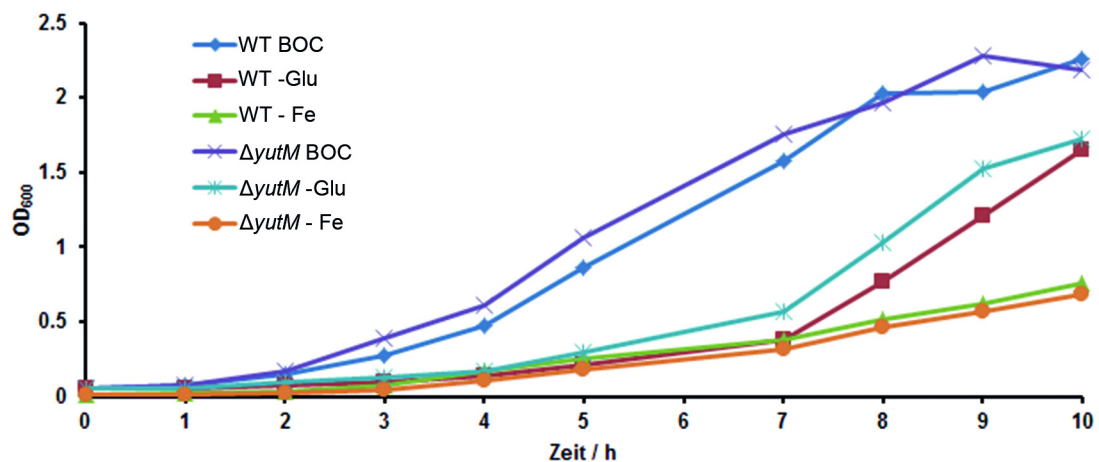


Abbildung 4.5 Wachstum von *Bacillus subtilis* 168 und AA01 im Vergleich unter verschiedenen Bedingungen: Standard BOC-MM (blau, bzw. violett), BOC-MM ohne Eisen (rot, bzw. hellblau), BOC-MM ohne Glutamat (grün bzw. orange).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mutante auch unter diesen Bedingungen keinen negativen Phänotyp zeigt. Daraus folgt, dass YutM zwar eine hohe Homologie zu SufA aufweist, aber in *Bacillus subtilis* physiologisch nicht die gleichen Aufgaben wahrnimmt.

4.1.2.3 Einfluss von SufU und YutM auf die Aktivität von Fe/S-Proteinen

Um den Einfluss der Proteine SufU und YutM auf die Aktivität verschiedener Eisen-Schwefel-Proteine zu untersuchen, wurde die Aktivität der folgenden Proteine aus dem Zellextrakt der Mutanten oder des Wildtyps getestet: Aconitase (Aco), welche einen [4Fe-4S]-Cluster besitzt, Succinat-Dehydrogenase (SDH), welche je einen [4Fe-4S]-, [3Fe-4S]- und [2Fe 2S]-Cluster besitzt und als Kontrolle Malatdehydrogenase (MDH), welche keinen Eisen-Schwefel-Cluster besitzt.

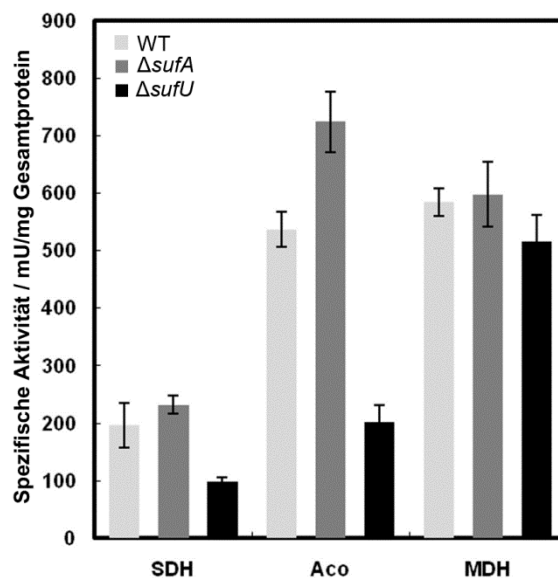


Abbildung 4.6 Aktivität von Succinat-Dehydrogenase (SDH), Aconitase (Aco) und Malatdehydrogenase (MDH) im Zellextrakt von Wildtypzellen oder $\Delta\text{sufA}/\Delta\text{sufU}$ Mutantenzellen. Die Aktivität ist bezogen auf den Gesamtproteingehalt des Zellextrakts.

Es zeigte sich dabei (Abb. 4.6), dass die Aktivität der Fe/S-Proteine Succinat-Dehydrogenase und Aconitase im Zelllysat der ΔsufU -Mutante um 50 bis 75% reduziert war, während die Aktivität der Malatdehydrogenase keine signifikanten Unterschiede zeigte. Im Gegensatz dazu war die Aktivität der genannten Proteine in der ΔsufA -Mutante insgesamt nicht signifikant beeinflusst, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nur SufU eine essentielle Rolle in der Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese von *Bacillus subtilis* spielt.

4.1.3 Charakterisierung von SufU

4.1.3.1 Rekombinante Expression und Reinigung von SufU

SufU wurde bereits im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit kloniert und exprimiert [123]. Das Gen wurde aus der chromosomalen DNA von *Bacillus subtilis* 168 amplifiziert und in den Expressionsvektor pET28a(+) kloniert. Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) und das rekombinante SufU wurde mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie als His₆-Fusionsprotein gereinigt. Das konzentrierte Protein wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie Blaufärbung visualisiert. Die Ausbeute betrug etwa 10 mg/L Bakterienkultur.

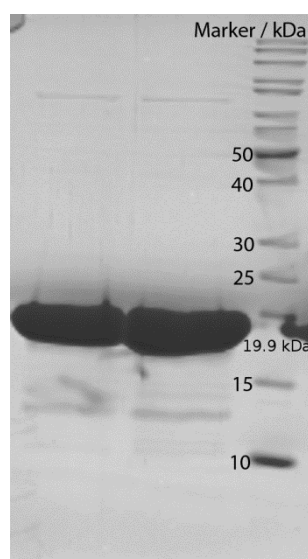


Abbildung 4.7 SDS-PAGE zweier Fraktionen von SufU nach Ni-NTA Aufreinigung.

4.1.3.2 Eisen-Schwefel-Cluster Rekonstitution auf SufU

Um zu bestätigen, dass SufU als Scaffoldprotein fungiert, sollte *in vitro* gezeigt werden, dass SufU in der Lage ist, einen Eisen-Schwefel-Cluster zu binden und zu übertragen. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden in Kooperation mit Dr. Daili Aguilier Netz und PD Dr. Antonio Pierik aus der Arbeitsgruppe von Prof. Roland Lill an der Philipps-Universität Marburg erarbeitet.

Zunächst wurde unter anaeroben Bedingungen versucht, einen Eisen-Schwefel-Cluster auf SufU zu rekonstituieren (s. 3.6.1). Im Gegensatz zum homologen IscU aus *E. coli* konnte SufU nicht mit gebundenem Cluster isoliert werden, was vermutlich auf die aerobe Reinigung zurückzuführen ist.

Unter anaeroben Bedingungen konnte auf SufU bei Einsatz eines 5-fachen Überschusses an Ammonium-Eisen(III)citrat und Li_2S ein Eisen-Schwefel-Cluster rekonstituiert werden. Der Cluster selbst ist instabil gegenüber Sauerstoff und Dithionit. Das UV/VIS-Spektrum des gebundenen Clusters ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

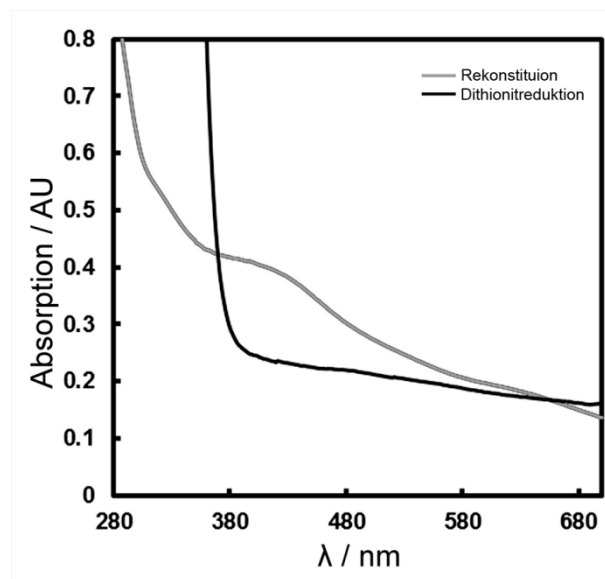


Abbildung 4.8 UV/Vis-Spektrum von SufU nach Clusterrekonstitution (grau) und nach Zugabe von 5 mM Dithionit (schwarz).

Das Spektrum zeigt eine breite Schulter bei 400 nm, sowie zwei Schultern bei 325 und 600 nm, die charakteristisch für $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster sind. Die Schultern verschwinden nach Reduktion mit Dithionit fast vollständig. Die gleichen spektroskopischen Charakteristika bleiben bestehen, wenn der Cluster mit geringerem Überschuss an Fe^{3+} und S^{2-} (2-4 \times) rekonstituiert wird (Abb. 4.9), was darauf hindeutet, dass auf SufU im Gegensatz zu IscU oder NifU bevorzugt $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster gebildet werden.

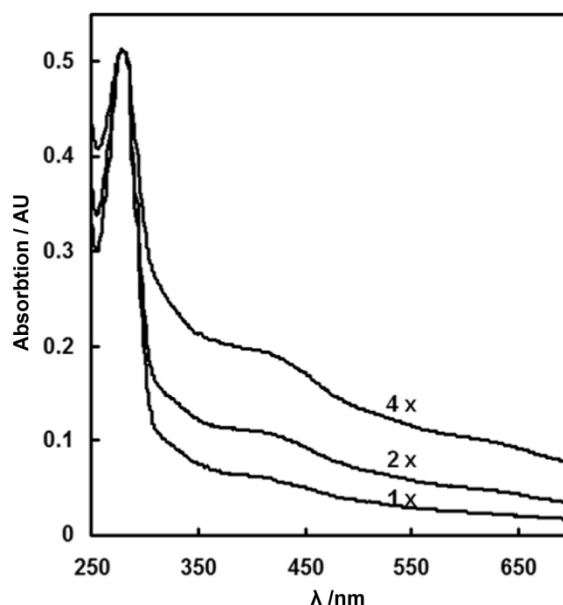


Abbildung 4.9 UV/VIS Spektren von rekonstituiertem SufU bei Verwendung geringerer Eisen-/Sulfidüberschüsse.

Die Bestimmung des Eisen- und Sulfidgehalts des rekonstituierten SufU zeigte auch, dass der Gehalt an gebundenem Eisen und Sulfid bei geringerem Überschuss abnimmt.

Tabelle 4.1 Bestimmung des Eisen- und Sulfidgehalts von SufU nach Rekonstitution und Entsalzung.

Verhältnis Eisen/Sulfid pro Monomer in der Rekonstitution	Fe/ Monomer SufU	S ²⁻ /Monomer SufU
0x	>0.005	>0.005
1x	0.19	0.12
2x	0.54	0.66
4x	1.48	1.54
5x	1.68	1.72

Es zeigt sich, dass selbst bei großem Überschuss das Verhältnis von Eisen/Sulfid zu Proteinmonomer lediglich bei etwa 1.5:1 liegt, wohingegen 4:1 zu erwarten wäre, sollte der Cluster auf einem SufU Monomer vorliegen. Dies deutet daraufhin, dass der Cluster auf einem SufU-Dimer gebunden vorliegt.

Um den Clustertyp exakt zu bestimmen, wäre es erforderlich entweder ein EPR- oder ein Mössbauer-Spektrum aufzuzeichnen. Dies war jedoch nicht möglich, da der Cluster auf SufU kein EPR-Signal zeigte, was ebenfalls typisch für $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster ist. Ein weiteres Problem ist die Labilität des Clusters gegenüber Dithionit, so dass kein Spektrum des Cluster in reduzierter Form erhalten werden konnte. Auch ein Mössbauer-Spektrum konnte nicht aufgezeichnet werden, da das beladene Protein in den benötigten Konzentrationen präzipitierte.

4.1.3.3 Transfer des Eisen-Schwefel-Cluster auf Leu1

Um SufU als Scaffold-Protein zu charakterisieren, war es als letztes erforderlich zu zeigen, dass es in der Lage ist, den gebundenen Cluster auch auf andere Zielproteine zu transferieren. Als Zielprotein wurde das Hefeprotein Leu1 aus Hefe gewählt, welches einen $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster für seine Funktion benötigt. Es wurde von Dr. Daili J. Aguilar Netz aus der Arbeitsgruppe Lill zur Verfügung gestellt und katalysiert die Umsetzung von (2*S*)-2-Isopropylmalat zu (2*R*,3*S*)-Isopropylmalat [136, 144].

Wurde *apo*-Leu1 mit rekonstituiertem SufU inkubiert, zeigte sich, dass die Aktivität von Leu1 schnell und effizient wiederhergestellt wurde. Im Vergleich dazu ist die chemische Rekonstitution von Leu1 mit den gleichen Eisen- und Sulfidkonzentrationen deutlich langsamer und wenig effizient (Abbildung 4.10).

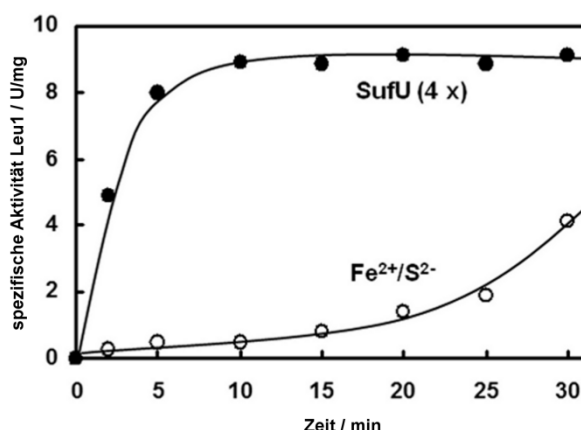


Abbildung 4.10 Anstieg der Spezifischen Aktivität von Leu1 bei Anwesenheit von beladenem SufU (●) im Vergleich zu chemischer Rekonstitution (○) mit gleichen Eisen- und Schwefelkonzentrationen.

Auch wenn SufU mit geringerem Eisen-/Schwefel Überschuss, für den Clustertransfer eingesetzt wurde, zeigte sich, dass die Aktivierung von Leu1 mit SufU möglich ist und die Aktivität zunimmt, je größer der eingesetzte Fe/S-Überschuss für die Rekonstitution von SufU war (Abb. 4.11).

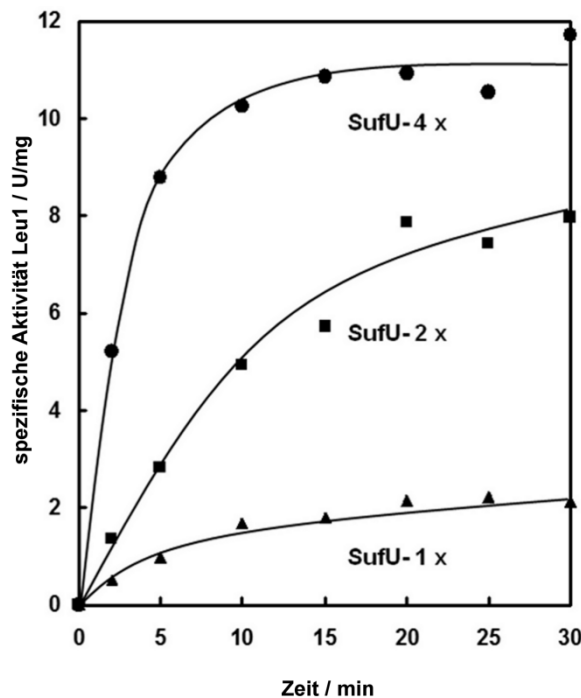


Abbildung 4.11 Anstieg der Spezifischen Aktivität von Leu1 bei Anwesenheit von beladenem SufU, welches mit verschiedenen Eisen- und Schwefelüberschüssen rekonstituiert wurde (▲: 1-facher Überschuss, ■: 2facher Überschuss, ●: 4-facher Überschuss).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SufU einen labilen [4Fe-4S]-Cluster bindet und diesen auf geeignete Zielproteine transferieren kann. Damit erfüllt SufU die Kriterien eines Scaffoldproteins.

4.1.3.4 Generierung und rekombinante Expression der SufU Varianten D43A, C41A, C66A und C128A

Um SufU weiter zu untersuchen, wurden die Varianten D43A, C41A, C66A und C128A generiert. Die Varianten wurden durch mutagene PCR von pET28a_sufU generiert. Alle Varianten wurden wie SufU als His₆-getaggttes Protein über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blaufärbung visualisiert (Abb. 4.12).

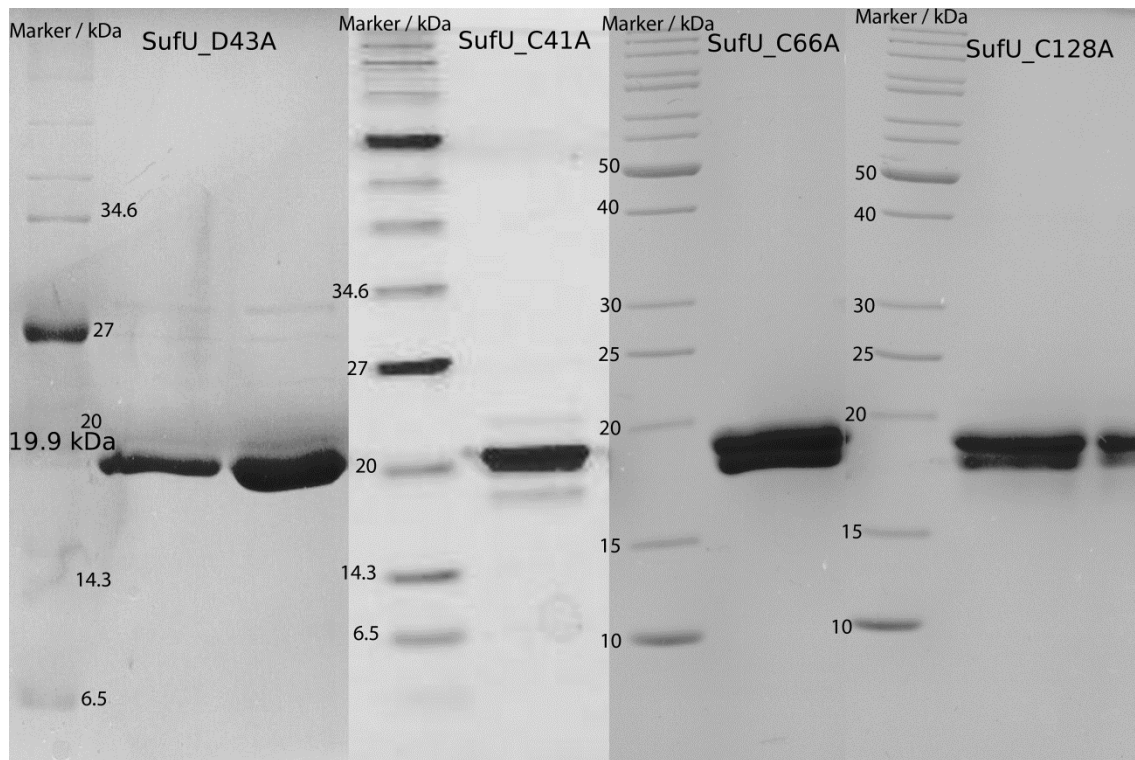


Abbildung 4.12 SDS-PAGE der SufU-Varianten (19.9 kDa) nach Ni-NTA-Reinigung.

4.1.3.5 Charakterisierung von SufU_D43A

Zunächst wurde die Variante SufU_D43A charakterisiert, da bei IscU und verkürztem NifU gezeigt wurde, dass der Austausch des auf das erste Cystein folgenden Aspartat gegen Alanin den Cluster stabilisieren kann [51, 54, 145, 146]. Im Gegensatz zum Wildtyp von SufU wurde SufU_D43A mit rötlicher Färbung gereinigt, was darauf hindeutete, dass zumindest einige Proteine einen Cluster gebunden hatten. Die Variante D43A zeigte tatsächlich eine Stabilisierung des Clusters. Das UV/VIS-Spektrum von SufU_D43A unmittelbar nach der Reinigung ist in Abb. 4.12 dargestellt.

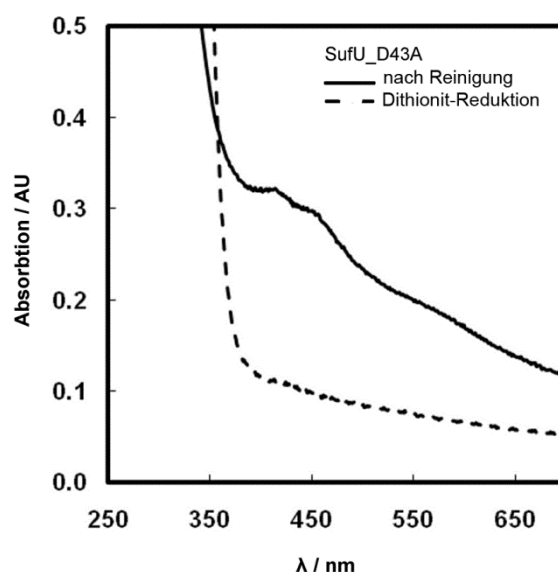


Abbildung 4.13 UV/VIS-Spektrum der SufU-Variante D43A nach Reinigung (durchgezogene Linie) und nach Zugabe von Dithionit (gestrichelte Linie).

Das UV/VIS-Spektrum zeigte auch hier kein eindeutiges Bild, jedoch scheint es sich auch hier um einen [4Fe-4S]-Cluster zu handeln, auch wenn die charakteristischen Merkmale schwächer ausgeprägt sind. Es liegen scheinbar auch Merkmale von [2Fe-2S]-Clustern vor, möglicherweise handelt es sich hier um eine Mischung aus [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Clustern. Auch diese Cluster waren nicht stabil gegenüber Dithionit und die Absorptionsbanden gingen verloren, wenn Dithionit zugegeben wurde. Der Eisen und Sulfid-Gehalt des gereinigten Proteins lag jedoch lediglich bei ~ 0.15 Eisen oder Sulfid pro Monomer, was auf eine unvollständige Beladung während der heterologen Expression hindeutet.

Darüber hinaus zeigte die D43A Variante eine ausgeprägte Instabilität des Proteins. Das Protein präzipitierte unmittelbar nach Entsalzung in einen Puffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.0), in dem kein Imidazol oder DTT enthalten waren. Auch in DTT-haltigem Puffer war das Protein nur begrenzt stabil und präzipitierte nach einigen Stunden. Einfrieren und erneutes Auftauen begünstigte die Präzipitation ebenfalls. Dies deutet darauf hin, dass diese Variante zur Stabilisierung des Clusters einen externen Liganden benötigt, wie es bereits für andere Fe/S-Proteine berichtet wurde [9].

Alle Messungen des Proteins wurden so schnell wie möglich durchgeführt um die Präzipitation zu vermeiden. Aufgrund der Instabilität konnten jedoch keine Eindeutigen Ergebnisse aus UV/VIS-Spektren erhalten werden. Auch dieses Variante lieferte keine eindeutigen EPR-Signale.

4.1.3.6 Charakterisierung der Varianten C41A, C66A und C128A

Abschließend wurde der Einfluss der konservierten Cysteinreste auf die Fähigkeit Eisen-Schwefel-Cluster zu bilden untersucht. Dazu wurden die gereinigten und Ankonzentrierten Varianten C41A, C66A und C128A rekonstituiert. Keine der Varianten trug nach Aufreinigung einen Cluster, entsprechend dem Wildtyp. Die Varianten zeigten auch eine geringere Ausbeute und geringe Stabilität, im besonderen C128A, welches deutlich instabiler war, als alle anderen Varianten und nach kurzer Zeit präzipitierte.

Die Rekonstitution des Clusters aller Varianten war erfolgreich und jede Variante konnte Fe/S-Cluster binden (Abb. 4.14), welche ebenfalls instabil gegenüber Dithionit waren.

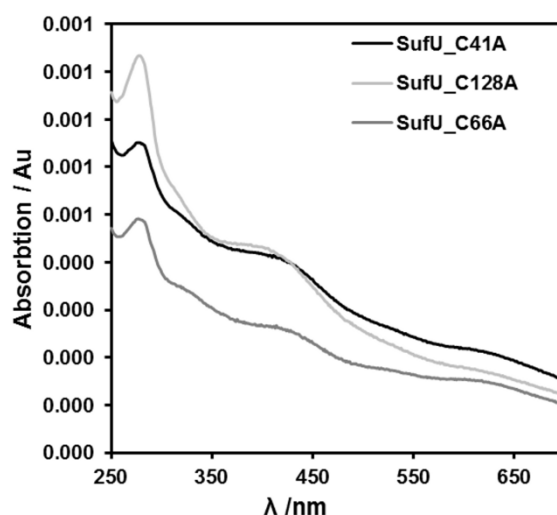


Abbildung 4.14 UV/VIS-Spektren rekonstituierter SufU-Varianten.

Dies zeigt, dass jede Variante in der Lage ist einen Cluster zu binden, aber dies könnte auf DTT im Puffer zurückzuführen sein, welches durch fehlendes Cystein freie Bindungsstellen absättigt (siehe 4.1.3.5) [9].

4.1.3.7 Stabilität von SufU in Abhängigkeit von Zn^{2+}

Die veröffentlichte NMR-Struktur von SufU (PDB-Code: 2AZH) zeigt, dass nach Reinigung die Eisen-Schwefel-Cluster-Bindungsstelle von einem Zn^{2+} -Ion besetzt war [55, 147].

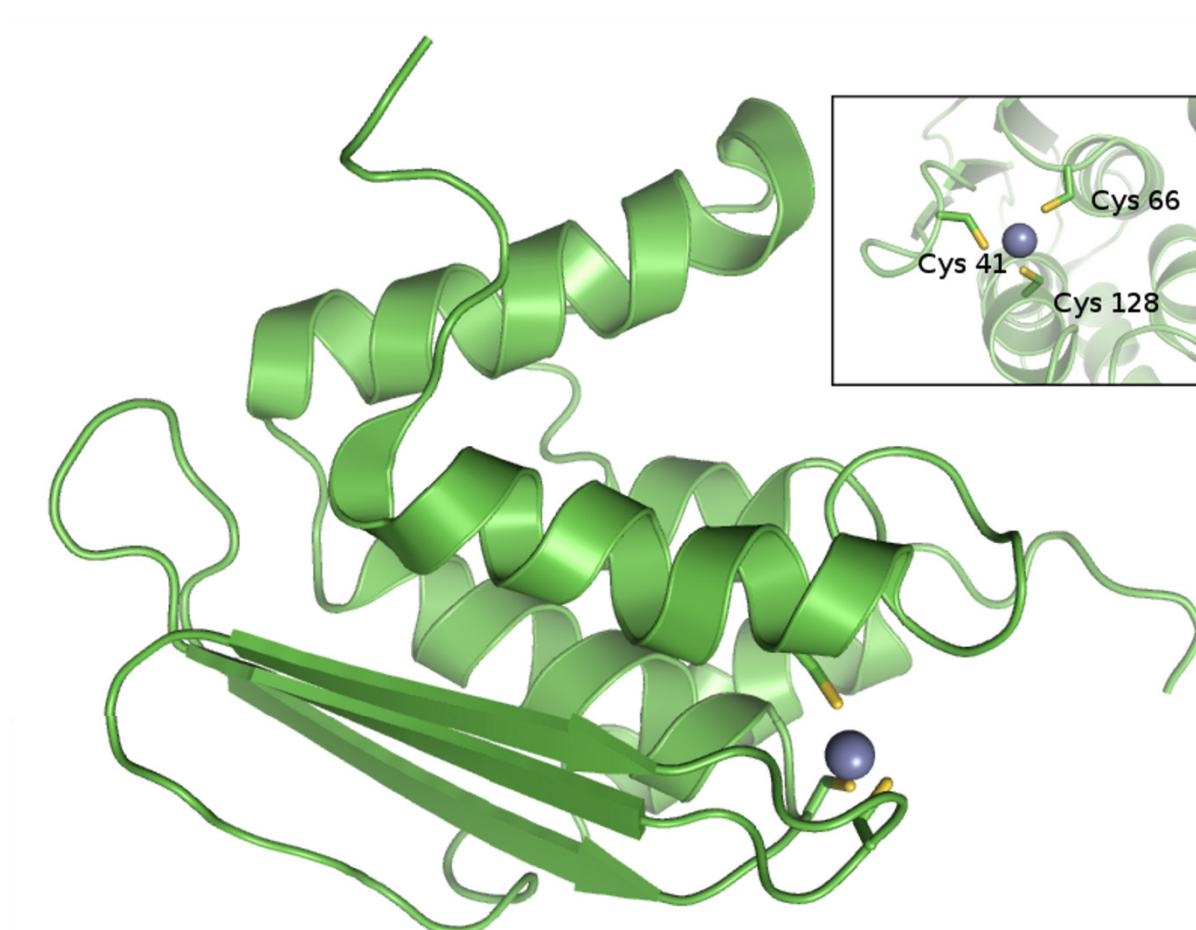


Abbildung 4.15 NMR-Struktur von *Bacillus subtilis* SufU (PDB-Code: 2AZH). Hervorgehoben ist das durch die konservierten Cysteinreste gebundene Zink. Kleines Bild: Um 90° gedrehte Darstellung der Fe/S-Cluster Bindungsstelle mit gebundenem Zink(II)-Ion.

Um zu überprüfen, ob auch unter den hier gewählten Bedingungen Zink an SufU gebunden ist, wurde das gereinigte SufU mittels ICP/MS auf seinen Metallgehalt analysiert (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Metallgehalt von SufU nach Ni-NTA-Reinigung.

Metall	mol Metall / mol Protein
Mn	< 0.01
Fe	0.02
Ni	< 0.01
Co	< 0.01
Cu	< 0.01
Zn	0.75

Die Messergebnisse zeigen, dass Zn als Metall mit höchster Abundanz in gereinigtem SufU zu finden ist. Um zu überprüfen, ob Zink einen Einfluss auf die Stabilität von SufU besitzt, wurden Proteinschmelzkurven mittels CD-Spektroskopie aufgezeichnet. Dafür wurden 2.5 μ M SufU und 2.5 μ M der Variante SufU_C41A in Puffer (2.5 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, pH 8.0) gemessen, sowie 2.5 μ M SufU in Puffer mit 2.5 μ M EDTA. Es zeigte sich, dass SufU in Gegenwart von EDTA deutlich destabilisiert wird (Abbildung 4.16).

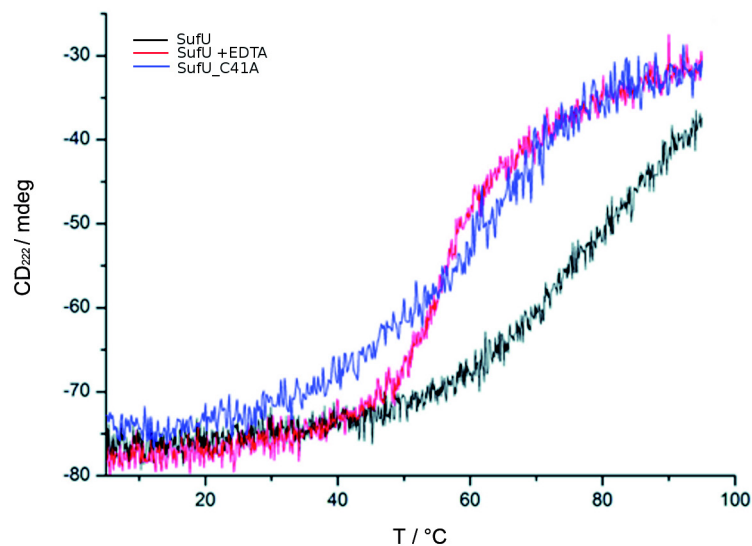


Abbildung 4.16 Mittels CD-Spektroskopie gemessene Schmelzkurven von 2.5 μ M SufU (schwarz), 2.5 μ M SufU in Gegenwart von 2.5 μ M EDTA (rot) und 2.5 μ M SufU Variante C41A (blau).

Der Schmelzpunkt von SufU sank in Gegenwart von EDTA um 23 $^{\circ}$ C von 80.3 ± 0.51 $^{\circ}$ C auf 57.08 ± 0.08 $^{\circ}$ C. Dies ist ein deutliches Zeichen dafür, dass SufU durch Zink stabilisiert wird. Im Gegensatz dazu hat die Variante SufU_C41A einen Schmelzpunkt von 55.52 ± 0.22 $^{\circ}$ C und ist daher bereits deutlich instabiler, als das native Protein. Die anderen SufU-Varianten waren zu instabil und präzipitierten im Verlauf der Messung.

4.2 Charakterisierung der Cysteindesulfurase SufS

Die zweite zentrale Komponente der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese ist die Cysteindesulfurase. Durch die Cysteindesulfurase wird Sulfid mobilisiert und an das Scaffoldprotein übertragen. In den Genom von *Bacillus subtilis* konnte mittels BLAST SufS identifiziert werden, eine Cysteindesulfurase, welche homolog zu sowohl SufS als auch IscS aus *E. coli* ist.

4.2.1 Klonierung und Expression von SufS

SufS wurde bereits in vorigen Arbeiten kloniert und exprimiert [123]. Das Gen wurde aus der chromosomalen DNA von *Bacillus subtilis* MR 168 mittels PCR amplifiziert und mittels TOPO-Klonierung in den pTrcHis-Vektor kloniert. SufS wurde mit N-terminalem His₆-Tag exprimiert und über Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt. Dabei konnten Ausbeuten von 4 mg Protein / L Kultur erzielt werden.

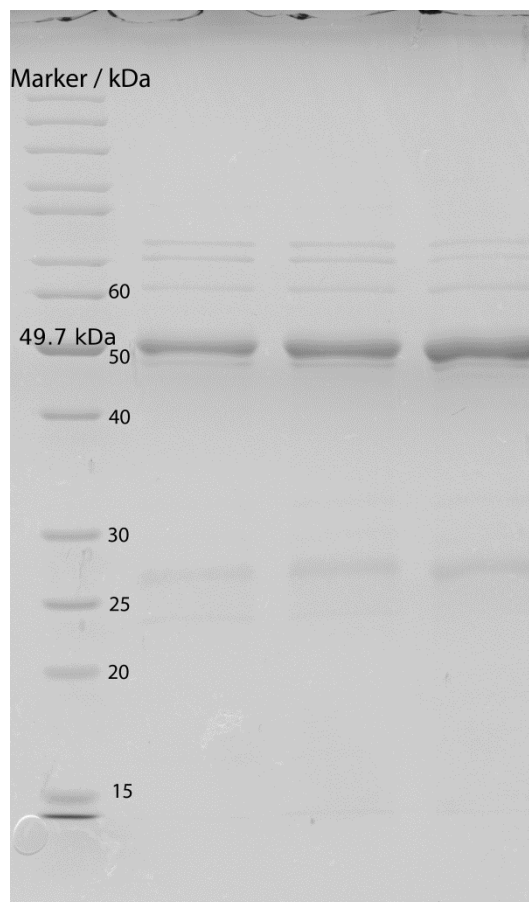


Abbildung 4.17 SDS-PAGE der Ni-NTA Elutionsfraktionen von SufS (49.7 kDa).

4.2.2 Kinetische Charakterisierung von SufS

Eine erste kinetische Charakterisierung von SufS wurde in vorigen Arbeiten begonnen [123]. darüber hinaus wurde parallel zu dieser Arbeit eine kinetische Charakterisierung von SufS von Selbach et. al. publiziert, deren Ergebnisse im Einklang mit dieser Arbeit stehen [148]. Es zeigte sich, dass SufS über nahezu keine Basalaktivität verfügt und durch *apo*-SufU aktiviert wird. Dadurch erhöht sich die Aktivität von SufS um den Faktor 40. Eine Aktivierung von SufS durch *holo*-SufU konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 4.18).

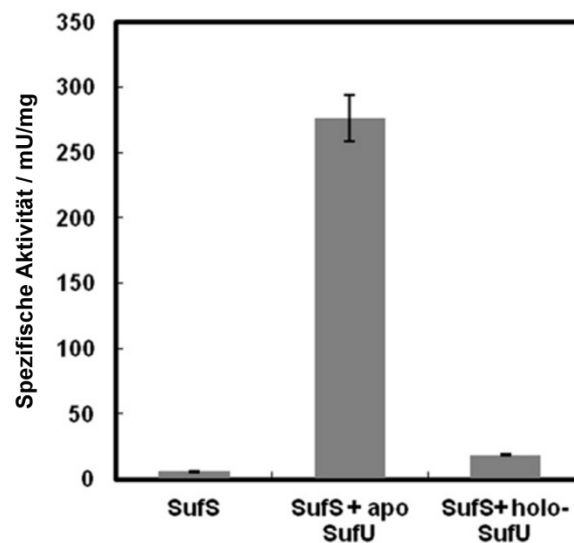


Abbildung 4.18 Vergleich der SufS-Aktivität in Ab- und Anwesenheit von *apo*- und *holo*-SufU.

Um die Interaktion zwischen SufU und SufS weiter zu untersuchen, wurden verschiedene kinetische Untersuchungen durchgeführt. Bereits zuvor wurde untersucht, wie sich die kinetischen Parameter von SufS bei hohem Überschuss an SufU und variabler Cysteinkonzentration verhalten. Dabei zeigte sich, dass die SufS-Aktivität einen Michaelis-Menten-artigem Verlauf folgt (Abbildung 4.19) [149].

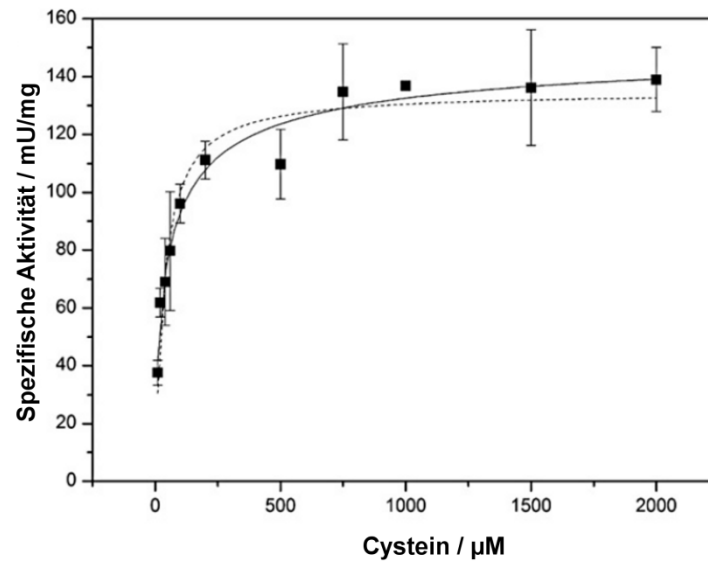


Abbildung 4.19 Kinetische Analyse von SufS bei konstanter SufU-Konzentration und variabler Cysteinkonzentration (durchgezogene Linie: Ausgleichsfunktion nach Hill; gestrichelte Linie: Ausgleichsfunktion nach Michaelis Menten).

SufS zeigt ebenfalls ein Michaelis-Menten-Verhalten, wenn die Cysteinkonzentration konstant gehalten wird und die SufU-Konzentration variiert wird. (Abbildung 4.20).

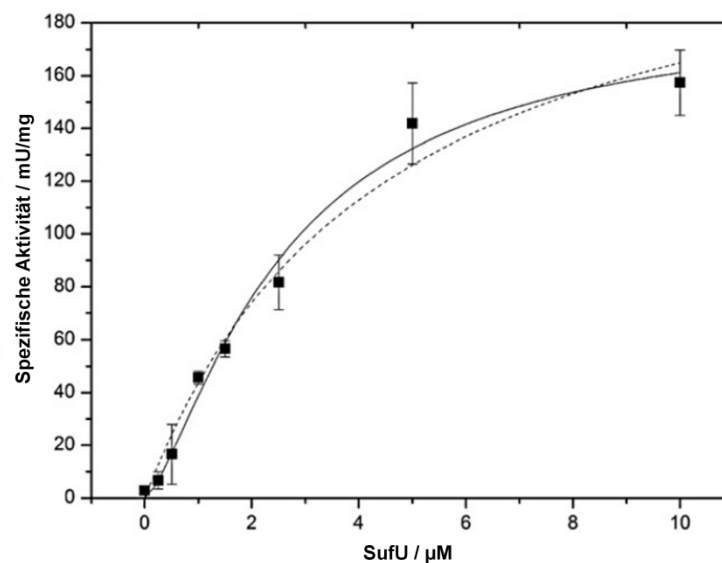


Abbildung 4.20 Kinetische Analyse von SufS bei konstanter Cysteinkonzentration und variabler SufU-Konzentration (durchgezogene Linie: Ausgleichsfunktion nach Hill, gestrichelte Linie: Ausgleichsfunktion nach Michaelis Menten).

In beiden Fällen können die kinetischen Parameter auch nach Hill bestimmt werden, wobei die Analyse nach Hill zusätzliche Hinweise über die Kooperativität des Vorganges liefert. Die ermittelten kinetischen Parameter sind in Tabelle 4.3 aufgelistet [149].

Tabelle 4.3 Kinetische Parameter von SufS.

Parameter	Cystein	SufU
$K_M / \mu\text{M}$	49.71 ± 15.81	2.63 ± 0.48
$v_{\max} / \text{mU/mg}$	153.54 ± 11.59	93.38 ± 9.68
$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	0.255 ± 0.007	0.155 ± 0.016
Hill-Parameter	0.61 ± 0.12	1.37 ± 0.22

Da SufS in dimerer Form vorliegt (siehe 1.2.3.1 und 1.2.4.1) deuten die Hill-Parameter darauf hin, dass die Bindung von Cystein (Hill-Parameter < 1) mit einem negativen kooperativen Effekt einhergeht, wohingegen die Bindung von SufU (Hill-Parameter > 1) mit einem positiven kooperativen Effekt einhergeht [149].

Da die Aktivität von SufS sowohl von der SufU-Konzentration, als auch von der Cysteinkonzentration abhängt, wurde versucht den Reaktionsmechanismus aufzuklären. Dafür wurde sowohl die SufU-Konzentration variiert (1.0, 2.5 und 5.0 μM SufU) als auch die Cysteinkonzentration (10-50 μM oder 1–1000 μM Cystein) und die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit v gegen die reziproke Cysteinkonzentration aufgetragen (Abb. 4.21) [149].

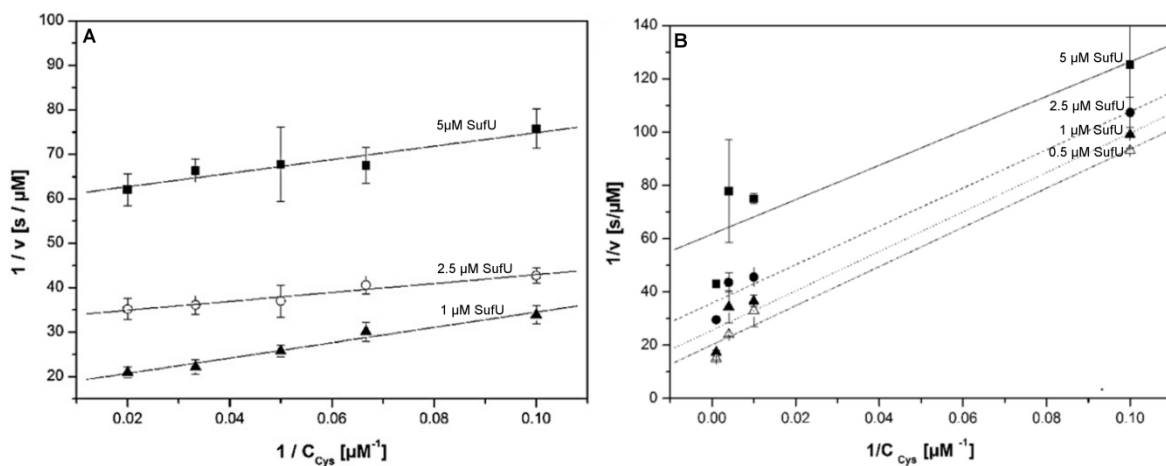


Abbildung 4.21 Ermittlung des Reaktionsmechanismus der Cysteindesulfurase. Die parallelen Linien deuten auf einen Ping-Pong-Reaktionsmechanismus hin. A: Messung im Konzentrationsbereich 10-50 μM Cystein B: Messung im Konzentrationsbereich 10 – 1000 μM Cystein.

Der parallele Verlauf der doppelt reziproken Plots deutet darauf hin, dass es sich bei dem Reaktionsmechanismus um einen Ping-Pong Bi-Bi Reaktionsmechanismus handelt [149].

4.2.3 Einfluss von EDTA auf die Cysteindesulfuraseaktivität

Da gezeigt werden konnte, dass SufU durch Zink stabilisiert wird und durch EDTA destabilisiert werden kann, wurde durch Zugabe von EDTA getestet, welchen Einfluss SufU gebundenes Zn^{2+} auf die Cysteindesulfuraseaktivität besitzt. Dafür wurden zu 0.25 μM SufS und 10 μM SufU steigende Konzentrationen von EDTA gegeben und die Cysteindesulfuraseaktivität bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.22 dargestellt.

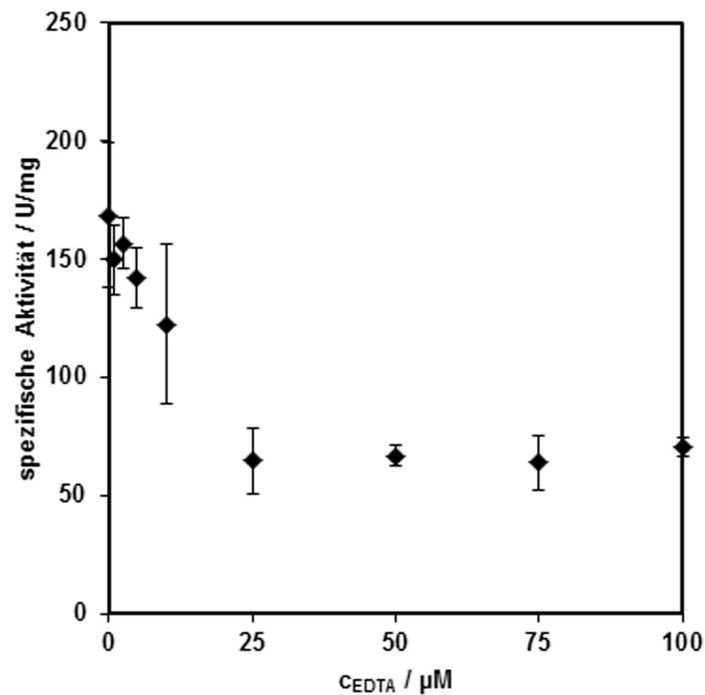


Abbildung 4.22 Cysteindesulfuraseaktivität von SufS in Gegenwart von SufU und steigenden Konzentrationen von EDTA.

Es zeigte sich, dass zunehmende EDTA-Konzentrationen zu einer deutlichen Verringerung der Desulfuraseaktivität führen, die sich, sobald das Verhältnis SufU:EDTA 1:1 überschritten ist jedoch nicht weiter verringert.

4.2.4 Eisen-Schwefel-Cluster-Rekonstitution auf SufU durch SufS

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Eisen-Schwefel-Cluster chemisch auf SufU rekonstituiert werden konnte. Daher wurde untersucht, ob SufS *in vitro* mit Cystein als Sulfidquelle einen Eisen-Schwefel-Cluster auf SufU rekonstituieren kann. Dafür wurden SufU und SufS unter anaeroben Bedingungen mit DTT und einem Überschuss Ammonium-Eisen(III)-Citrat inkubiert, bevor durch Zugabe von Cystein die Reaktion gestartet wurde.

Es zeigte sich, dass SufS in der Lage ist einen Eisen-Schwefel-Cluster auf SufU zu rekonstituieren, wie im UV/VIS-Spektrum gut zu erkennen ist (Abbildung 4.23). Nach Entsalzung konnte ein Sulfid-Gehalt von 1.65 ± 0.05 mol Sulfid / mol SufU bestimmt werden, was der gleichen Menge Sulfid entspricht, die bei chemischer Rekonstitution gebunden war (siehe 4.1.3.2).

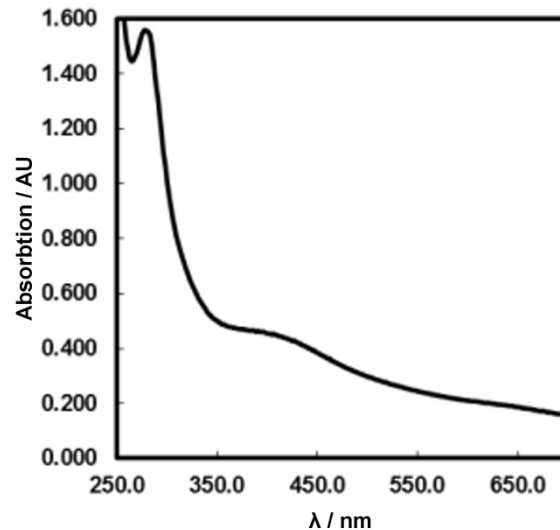


Abbildung 4.23 UV/VIS Spektrum der Eisen-Schwefel-Cluster-Rekonstitution mit SufS und Cystein als Sulfidquelle.

4.3 Interaktion von SufU und SufS

4.3.1 Kinetische Untersuchungen der Interaktion zwischen SufS und SufU

Eine wichtige Frage war es, welche Cysteinreste von SufU für die Interaktion mit SufS wichtig sind. Da es sich um einen Ping-Pong Reaktionsmechanismus handelt, muss zunächst Sulfid auf SufS übertragen werden und das Sulfid anschließend auf SufU transferiert werden. Wenn man SufS mit SufU und dessen Varianten inkubierte, zeigte sich, dass keine der SufU Varianten SufS aktivieren konnte (Abbildung 4.24), und die Aktivität von SufS über Basalaktivität hinaus steigerte.

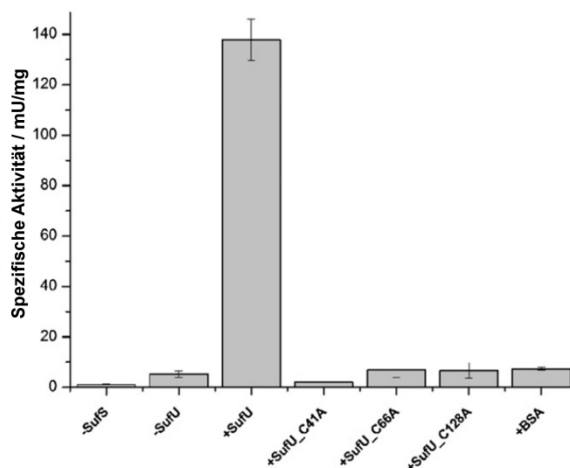


Abbildung 4.24 Aktivierung von SufS durch SufU und verschiedene SufU Varianten.

Daher stellte sich die Frage, ob die SufU Varianten entweder nicht mit SufS interagieren, oder ob diese Zwar mit SufS interagieren, aber die Reaktion nicht aktivierten. Um dies zu untersuchen wurde nun SufS zusammen mit 20fachem Überschuss SufU und jeweils 20fachen Überschuss einer Variante inkubiert und getestet, ob die Varianten als Inhibitoren fungieren können (Abb. 4.25).

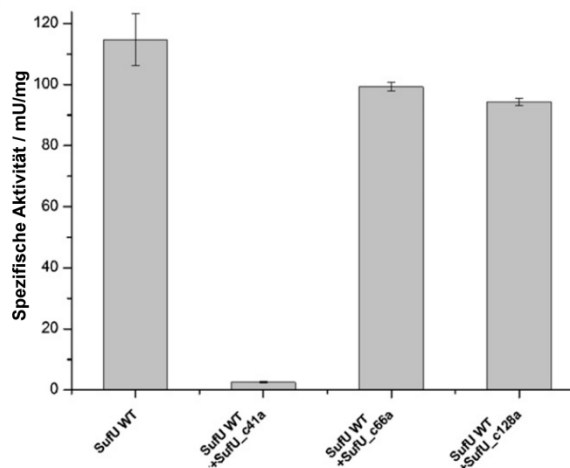


Abbildung 4.25 Spezifische Aktivität von SufS bei Inkubation mit SufU und jeweils einer SufU Variante.

Es zeigte sich, dass die Variante SufU_C41A einen starken inhibitorischen Effekt hatte und die Aktivität von SufS auf Basalaktivität reduzierte, während die anderen Varianten keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von SufS hatten.

Um die Inhibition durch die Variante SufU_C41A genauer zu untersuchen, wurde die Aktivität von SufS bei unterschiedlichen Überschüssen SufU und verschiedenen Konzentrationen von SufU_C41A gemessen (Abb. 4.26).

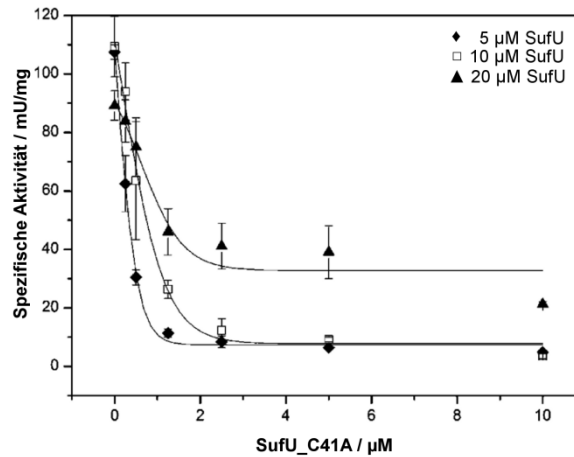


Abbildung 4.26 Inhibition von SufS durch die SufU_C41A Variante.

Es zeigte sich, dass die Inhibition von SufS unabhängig von der Konzentration von WT-SufU war, und SufS bereits bei einem Verhältnis SufS zu SufU_C41A von 1:1 fast vollständig inhibiert wurde. Wenn man die Aktivität von SufS als Maß für die Inhibition nimmt, erhält man bei Annahme eines 1:1 Bindungsverhältnisses eine Inhibitionskonstante K_i von 41 nM für SufU_C41A. Dieser Wert wurde von Dr. Marcus Miethke mittels Massenwirkungs-Fit ermittelt.

4.3.2 Physikalische Interaktion zwischen SufS und SufU

4.3.2.1 Gelfiltrationsexperimente zur Analyse des SufS/SufU Komplexes

Zur weiterführenden Charakterisierung der Interaktion von SufU und SufS wurden Gelfiltrationsexperimente mit einer analytischen Superdex 200 5/150 Gelfiltrationssäule durchgeführt. Dabei wurden SufS allein, sowie SufS und SufU oder eine Variante aufgetragen und die apparente Größe von SufS bestimmt. Es zeigte sich zunächst, dass für SufS nur eine Größe von 113 kDa bestimmt werden konnte, was einem SufS Dimer entspricht. Wurden die Proteine aber zusätzlich mit Cystein inkubiert konnte bei Inkubation mit der SufU_C41A Variante eine Größe von 154 kDa bestimmt werden, was einem SufS₂SufU₂ Heterotetramer entspricht (siehe Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Durch Gelfiltration ermittelte Komplexgrößen von SufS und SufU Varianten.

Proteine	Bestimmte Komplexgröße / kDa
SufS	113
SufS + SufU	113
SufS + SufU_C41A	113
SufS + SufU + Cystein	113
SufS + SufU_C41A + Cystein	154

Diese Ergebnisse stützen die These, dass SufS und SufU_C41A eine stabile Interaktion aufbauen. Im Gegensatz zu Cysteindesulfurasen des ISC-Systems aus anderen Organismen, konnte hier keine stabile physikalische Interaktion zwischen der nativen Cysteindesulfurase und dem Scaffoldprotein nachgewiesen werden. Selbach *et. al.* zeigten, dass dies vermutlich am His₆-Tag der heterolog exprimierten Proteine SufS und SufU liegt [148].

4.3.2.2 Pull-down-Assays zur weiteren Charakterisierung der Interaktion

Um die Interaktion zwischen nativem SufS und SufU eingehender zu untersuchen und die störende Wirkung des His₆-tag zu umgehen, wurde in Zusammenarbeit mit Hannes Landmann im Rahmen seiner Diplomarbeit SufS in den pTrCHis2-TOPO Vektor kloniert, wobei das native Stop-Codon beibehalten wurde, so dass SufS ohne His-Tag exprimiert werden konnte [129].

Für die Analyse wurden natives His₆-getagtes SufU, sowie die SufU-Varianten C41A, C66A und C128A durch ihren His-Tag an Ni-NTA immobilisiert und anschließend mit Zellextrakt von *E. coli* BL21 Zellen inkubiert, in denen Tag-freies SufS produziert wurde. Als Negativkontrolle diente eine unbeladene Ni-NTA Säule. Nach Waschen und Eluieren der Säulen zeigte sich, dass nur SufU und SufU_C41A SufS aus dem Überstand binden konnten, da sie koeluierten. SufU_C66A und SufU_C128A konnten kein SufS binden, auch eine unspezifische Bindung an die Ni-NTA Säule konnte ausgeschlossen werden (Abb. 4.27).

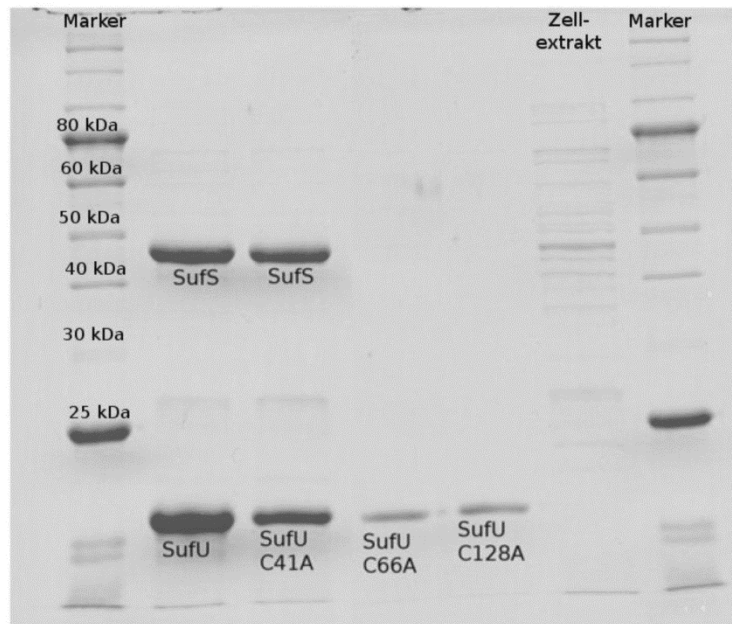


Abbildung 4.27 SDS-PAGE der SufU-SufS Pull-down Assays zum Nachweis einer physikalischen Interaktion.

Diese Ergebnisse zeigen, dass SufU und SufS miteinander interagieren können und die Stabilität dieser Interaktion aber von Proteintags beeinträchtigt wird. Die Beeinträchtigung durch den His-Tag ist stark genug, um eine stabile durch Gelfiltration nachweisbare Interaktion zu unterbinden, aber nicht stark genug, um die Aktivierung von SufS durch SufU zu unterdrücken.

4.4 Untersuchung und Charakterisierung des potentiellen Frataxin-Homologen YdhG

Die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese benötigt neben Schwefel, welcher in allen Systemen aus Cystein mobilisiert wird, auch Eisen. Freies Eisen ist jedoch toxisch für Zellen und benötigt daher ein geeignetes Transportprotein. In Eukaryoten konnte als Eisentransportprotein Frataxin identifiziert werden [90]. Zu Frataxin homologe Proteine wurden auch in anderen Organismen, wie *E. coli* oder *A. ferrooxidans* identifiziert, wo sie mit der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese assoziiert sind, die Funktion jedoch noch nicht völlig geklärt ist [107, 112, 150]. In *Bacillus subtilis* existiert kein Protein, das auf Sequenzebene größere Ähnlichkeit zu Frataxin besitzt, aber Qi und Cowan waren in der Lage ein strukturell homologes Protein zu identifizieren: YdhG [122].

Qi und Cowan konnten zeigen, dass YdhG Eisen binden kann, variierend von einem Eisen-Atom pro Dimer bis zu zwei Eisen-Atomen pro Monomer. Darüber hinaus berichteten sie, dass YdhG mit IscU von *Thermotoga maritima* interagiert und das gebundene Eisen auf dieses transferieren kann [122].

4.4.1 Identifizierung von YdhG über native Proteom-Analyse

Um Frataxin oder andere Komponenten des intrazellulären Eisen-Transportsystems zu direkt zu identifizieren, wurde von Dr. Marcus Miethke und Hannes Landmann in Kooperation mit Prof. Andreas Seubert und David Nette ein nativer Proteom-Analyse-Ansatz etabliert um Metall-Protein Interaktionen in Bakterien zu identifizieren und analysieren. Für die Untersuchung wurde *Bacillus subtilis* in Vollmedium kultiviert. Das Proteom der Zellen wurde unter anaeroben Bedingungen mittels nativer 2D Gel-freier Chromatographie untersucht, um die nativen Redoxzustände proteingebundener Metalle zu erhalten. Der Zellextrakt wurde hierfür mittels Anionen-Austausch- und Größenausschluss-Chromatographie untersucht und die erhaltenen Fraktionen wurden einer quantitativen Metallanalyse mittels ICP-MS unterzogen, sowie der Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrischer peptide fingerprint analyse.

Zur Quantifizierung der Proteine im SDS-Gel wurde SyproRuby verwendet, wobei BSA als interner Standard verwendet wurde.

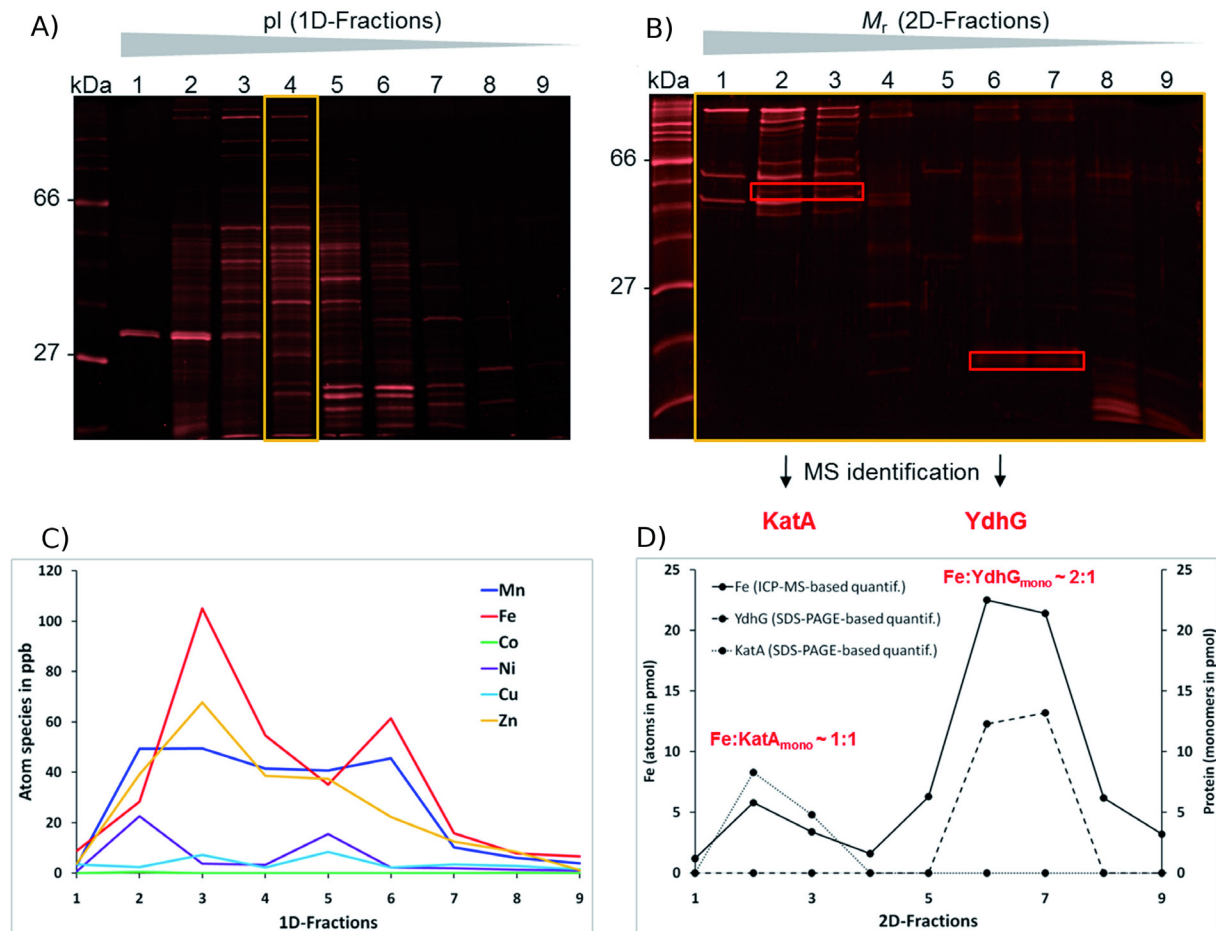


Abbildung 4.28 A) SDS-PAGE (12% [w/v] Acrylamid) der Fraktionen der ersten Dimension (Anionenaustauscher Chromatographie). Die gelb markierte Spur wurde in der zweiten Dimension analysiert. B) SDS-PAGE (15% [w/v] Acrylamid) der 2. Dimension erhalten durch Gelfiltration. C) Analyse der Metallionen in den einzelnen Fraktionen der ersten Dimension ermittelt durch ICP-MS. D) Korrelation der Proteinquantifizierung von KatA und YdhG mit dem ermittelten Eisengehalt in den Fraktionen der 2 Dimension.

Eine der Fraktionen aus der ersten Dimension zeigte, nach Auftrennung in zweiter Dimension (Abb. 4.28), zwei distinkte Eisen-assoziierte Proteinspezies, die über MS-Identifikation aller Banden festgestellt wurden. Diese distinkten Spezies konnten als das potentielle Frataxinhomologe YdhG und die vegetative Katalase KatA identifiziert werden, welche als putativer intrazellulärer Eisentransporter, bzw. Häm-abhängiges Redoxprotein vorhergesagt werden. Die Quantifizierung des Eisen-Protein-Verhältnisses ergab für KatA eine scheinbare Bindungsstöchiometrie von 0.7:1 (4.6 ± 1.6 mol Eisen zu 6.5 ± 2.4 mol KatA Monomer), während sich für YdhG eine Stöchiometrie von 1.7:1 ergab (21.9 ± 0.7 mol Eisen zu 12.7 ± 0.6 mol YdhG Monomer). Die gefundenen Stöchiometrien bilden die ersten Korrelationen basierend auf dem isolierten physiologischen Bindungszustand von Eisen-gesättigten Zellen

Die ermittelte Stöchiometrie für KatA kann als Proof-of-Principle für die Robustheit der stöchiometrischen Quantifizierung betrachtet werden, da frühere Kristallisationsexperimente und biochemische Untersuchungen ein 1:1 Bindungsverhältnis von Eisen zu Proteinmonomer für andere vegetative Katalasen bestimmt, unter anderem bei *Proteus mirabilis* [151], *Enterococcus faecalis* [152] oder *Helicobacter pylori* [153].

4.4.2 *In vitro* Analyse von YdhG

4.4.2.1 Klonierung und Expression von YdhG

Um weitere *in vitro* Untersuchungen an YdhG vornehmen zu können, wurde das Gen *ydhG* aus der chromosomalen DNA von *Bacillus subtilis* ATCC 21332 amplifiziert und in den pET28a(+)-Vektor mit N-terminalem His₆-Tag kloniert. Das Protein wurde bei 18 °C über Nacht in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert und über Ni-NTA-Chromatographie gereinigt (Abb. 4.29). Es konnte eine Ausbeute von etwa 4 mg/L Bakterienkultur erhalten werden.

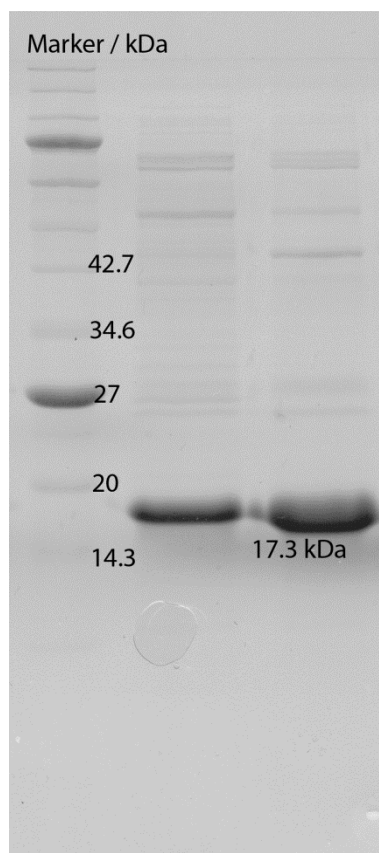


Abbildung 4.29 SDS-PAGE von zwei Fraktionen der Reinigung von YdhG.

4.4.2.2 Eisenbindung und Eisentransfer durch YdhG

Um die Eisenbindung und das ermittelte Eisen-Protein Verhältnis zu bestätigen wurde YdhG unter anaeroben Bedingungen mit verschiedenen Eisensalzen inkubiert und das gebundene Eisen nach Entsalzung über eine PD-10 Säule mittels ICP-MS Analyse oder photometrisch mit Feren quantifiziert. Als Eisensalze wurden Ammonium-Eisen(III)-citrat (FAC), FeCl_2 und Fe(III)[DHB]_3 verwendet, letzteres ist ein Analogon des Hydrolyseprodukts von Bacillibactin $\text{Fe-(DHB-Thr-Gly)}_3$ [4]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.30 dargestellt.

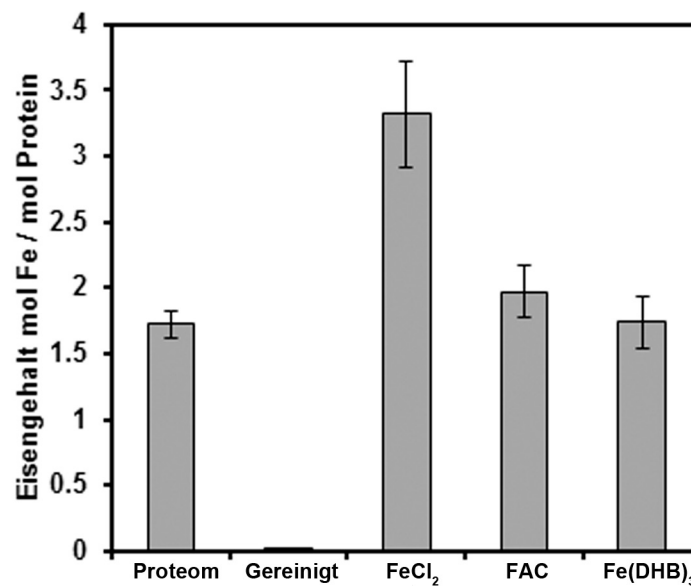


Abbildung 4.30 Eisengehalt von YdhG nach Beladung unter Verwendung verschiedener Eisen-Salze im Vergleich mit dem durch Proteomanalyse bestimmten Eisengehalt.

Es zeigte sich, dass YdhG von etwa 1.5 bis 3.2 mol Fe / mol Protein binden konnte, je nachdem, welches Eisensalz verwendet wurde, was in etwa ermittelten Eisengehalt im Proteom übereinstimmt (siehe oben). Unmittelbar nach Reinigung konnte kein Eisen auf YdhG nachgewiesen werden ($4.2 \cdot 10^{-5}$ mol Fe / mol Protein).

Um zu testen, ob die Eisenbindung physiologische Relevanz besitzt, wurde die Rekonstitution von SufU durch Fe-YdhG untersucht. Für dieses Experiment wurden 400 μM YdhG unter anaeroben Bedingungen mit Ammonium-Eisen(III)-Citrat beladen und anschließend mittels Gelfiltration von überschüssigem Eisen befreit. Anschließend wurden 200 μM beladenes YdhG, 50 μM SufU und 0.5 μM SufS unter anaeroben Bedingungen inkubiert (siehe 3.6.1) und der Aufbau des Clusters durch Zugabe von 2.5 mM Cystein gestartet. Die Reaktion wurde über die Zeit mittels UV/VIS-Spektrometrie verfolgt (Abb. 4.31).

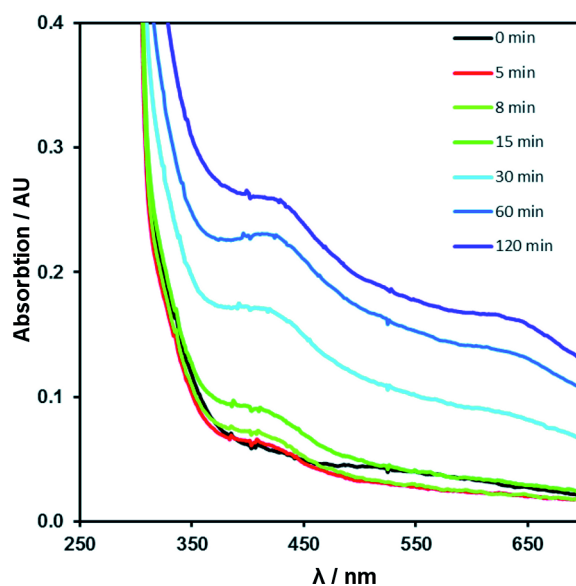


Abbildung 4.31 Zeitlicher Verlauf der Clusterrekonstitution auf SufU, bei Verwendung von eisenbeladenem YdhG und SufS als Eisen- und Sulfidquelle.

Es zeigte sich, dass sich im Laufe von zwei Stunden ein Eisen-Schwefel-Cluster auf SufU bildete. Es handelt sich auch hier anscheinend um einen [4Fe-4S]-Cluster, der auch bei chemischer Rekonstitution generiert wird.

4.4.2.3 Transfer des durch YdhG aufgebauten Clusters auf Aconitase CitB

Um die *in vitro* Untersuchungen zu komplementieren, wurde getestet, ob ein durch YdhG aufgebauter Cluster von SufU auf ein *apo*-Zielprotein übertragen werden kann. Als Zielprotein wurde *Bacillus subtilis* Aconitase (CitB) verwendet. Apo-CitB wurde von Hannes Landmann im Rahmen seiner Diplomarbeit kloniert und exprimiert und durch EDTA Behandlung in die *apo*-Form überführt, so dass inaktive Aconitase erhalten wurde [129].

Zunächst wurde, wie bereits beschrieben, ein Cluster mittels YdhG und SufS auf SufU unter anaeroben Bedingungen rekonstituiert. Die Rekonstitutionsmischung wurde anschließend mit *apo*-CitB versetzt. Anschließend wurde nach verschiedenen Zeitpunkten die Aconitase-aktivität durch einen gekoppelten Aconitase - Isocitrat-dehydrogenase Assay bestimmt.

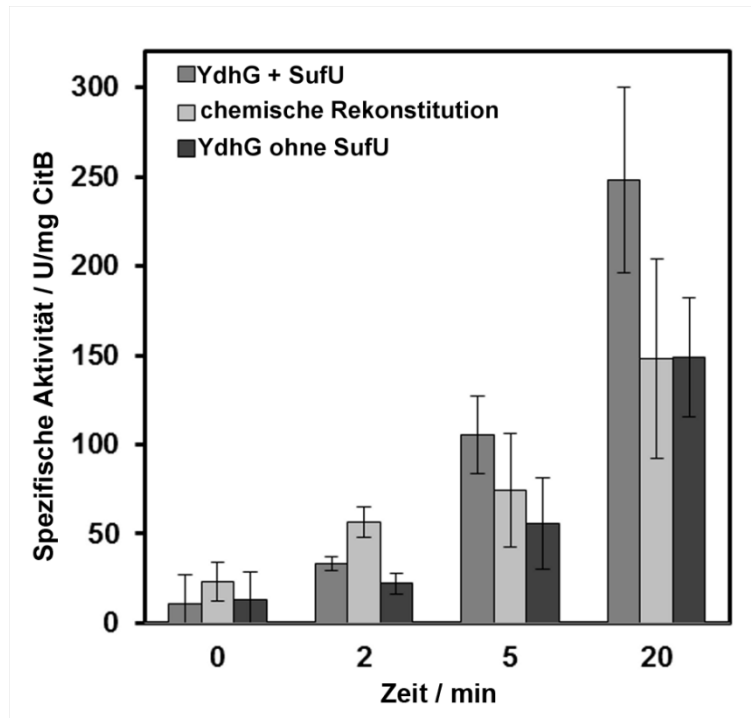


Abbildung 4.32 Aktivität der Aconitase im Verlauf der Zeit nach Clustertransfer oder chemischer Rekonstitution.

Es zeigte sich, dass die Aconitaseaktivität mit der Zeit wiederhergestellt werden konnte (Abb. 4.32), was auf erfolgreichen Clustertransfer hindeutet. Zur Kontrolle wurde eine chemische Rekonstitution mit Ammonium-Eisen(III)-citrat und Li_2S , in den gleichen Konzentrationen, die in der Reaktionsmischung vorhanden waren, durchgeführt. Dadurch konnte eine rein chemische Rekonstitution ausgeschlossen werden. Zum anderen wurde der Assay mit YdhG als Eisenquelle und Li_2S als Sulfidquelle durchgeführt um zu testen, ob YdhG ebenfalls in der Lage ist Eisen-Schwefel-Cluster auf Zielproteinen aufzubauen. Die Aconitaseaktivität der Clustertransferprobe lag um etwa 80 % höher als in den beiden Kontrollproben, was darauf hindeutet, dass ein Clustertransfer stattgefunden hat und dieser effizienter ist als durch chemische Rekonstitution. Damit konnte erstmals *in vitro* ein vollständiger Clustertransfer gezeigt werden, der alle essentiellen Komponenten der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese vereint: Eisen- und Schwefel-Donoren (YdhG und SufS), ein Scaffold-Protein (SufU) und ein *apo*-Zielprotein (CitB).

4.4.3 *In vivo* Analyse von YdhG

4.4.3.1 Generierung der $\Delta ydhG$ Mutante und weiterer Mutanten

Um die physiologische Relevanz von YdhG und seinen Einfluss auf *Bacillus subtilis* zu untersuchen, wurden abschließend mehrere Mutanten erzeugt. Zunächst wurde das *ydhG* Gen aus dem Chromosom von *Bacillus subtilis* ATCC 21332 deletiert und gegen eine *mls* Resistenzkassette ersetzt. Der Stamm ATCC 21332 wurde ausgewählt, da dieser zur Produktion von Bacillibactin in der Lage ist. Die Deletionsmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp nur kleine Kolonien (einen so genannten „small-colony“-Phänotyp).

Auf Basis dieser Mutante wurde eine Komplementationsmutante erstellt, bei der *ydhG* unter Kontrolle des Xylosepromotors in die AmyE-Site eingebracht wurde. YdhG wurde hierbei durch Fusions-PCR mit den *amyE*-Flanken des pX-Vektors fusioniert und anschließend der *Bacillus subtilis* Stamm mit dem Fragment transformiert.

Um die Auswirkungen der $\Delta ydhG$ -Mutante besser mit denen der $\Delta sufU$ Mutante vergleichen zu können, wurde die $\Delta sufU$ Mutante ebenfalls im ATCC 21332 Stamm generiert. Die benötigten Amplifikate wurden direkt aus der chromosomalen DNA der Mutante im Stamm 168 mittels PCR generiert und der ATCC 21332 Stamm mit diesen transformiert.

4.4.3.2 Wachstumsanalyse der $\Delta ydhG$ Mutante

Die ersten Wachstumsanalysen der $\Delta ydhG$ Mutante zeigten, wie bereits angemerkt, einen so genannten „small-colony“-Phänotyp. Darüber hinaus war die Mutante nicht in der Lage, in Eisen-supplementiertem Minimal-Medium anzuwachsen, was auf eine starke Störung des Stoffwechsels hindeutet. Auch in Vollmedium zeigte die Mutante ein verringertes Wachstum (Abb. 4.33).

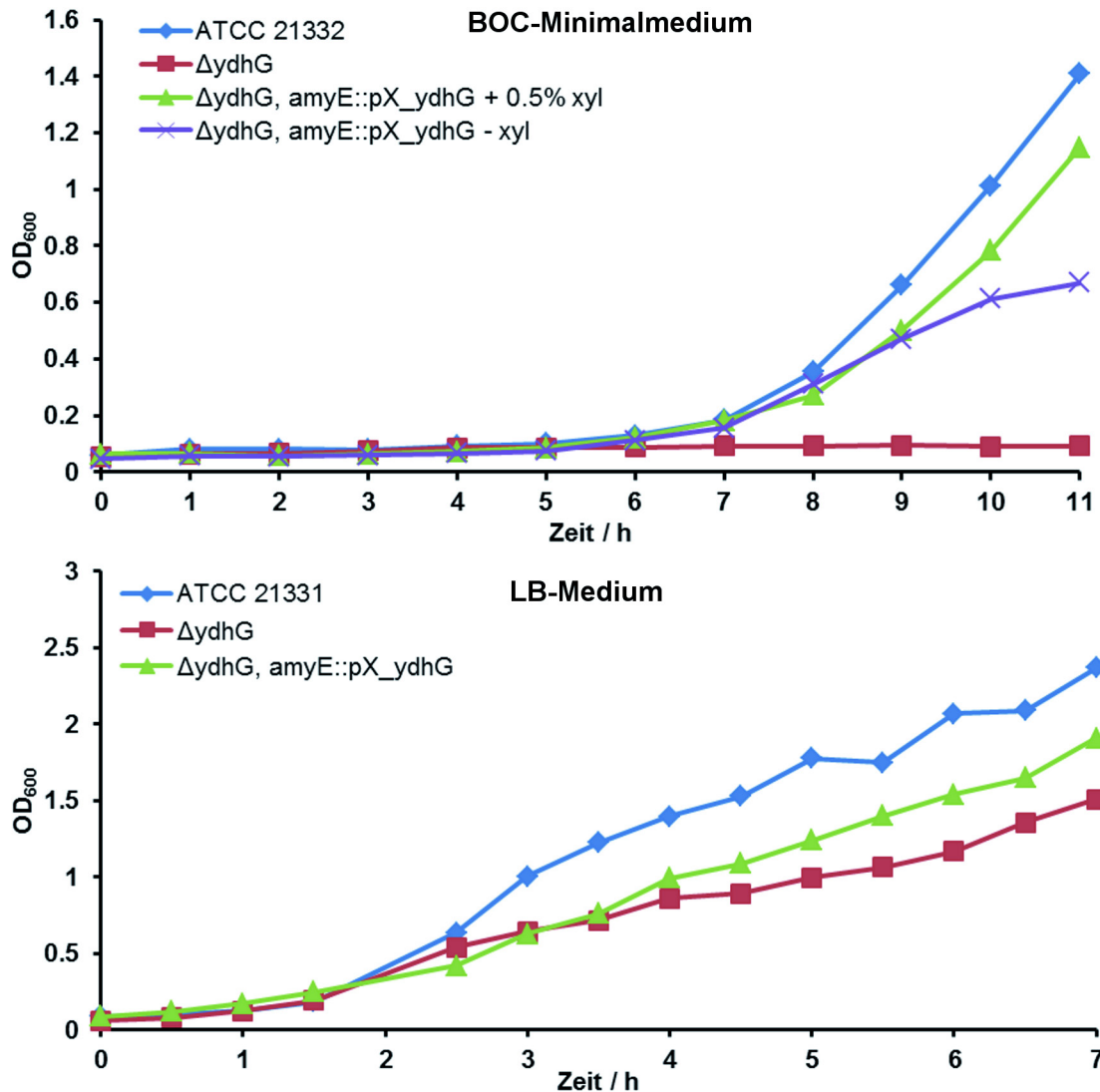


Abbildung 4.33 Wachstum der $\Delta ydhG$ Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp oder der Komplementationsmutante in Minimalmedium (oben) und Vollmedium (unten).

Die Komplementationsmutante war in der Lage den Phänotyp teilweise aufzuheben, darunter auch den „small colony“ Phänotyp.

4.4.3.3 Physiologischer Einfluss von YdhG

Um den weiteren Einfluss von YdhG zu untersuchen, wurden analog zur SufU Mutante die Aktivität der Aconitase und der Malat-Dehydrogenase aus dem Zellextrakt untersucht. Hierfür wurden die Zellen in 50 mL LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 angezogen, zentrifugiert, mit Wasser gewaschen und in 1 mL Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Aktivität der Proteine aus dem Zellextrakt bestimmt.

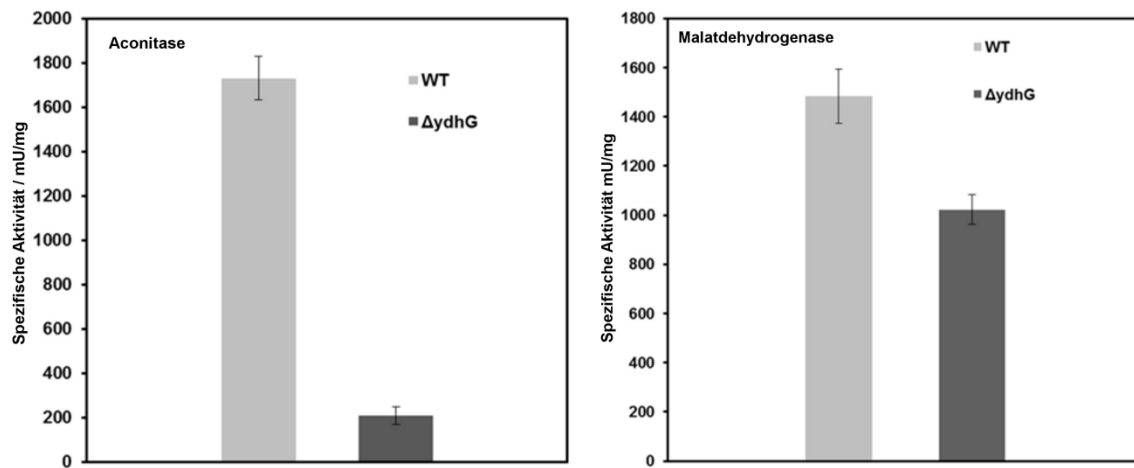


Abbildung 4.34 Aktivität von Aconitase und Malatdehydrogenase im Zellextrakt von *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (WT) und der $\Delta ydhG$ Mutante.

Es zeigte sich (Abb. 4.34), dass die Aktivität der Aconitase deutlich vermindert war (~10 % im Vergleich zum Wildtyp), während sich bei Malat-Dehydrogenase nur eine geringe Verminderung der Aktivität zeigt (~70 % im Vergleich zum Wildtyp).

Diese deutlichen Unterschiede in der Aktivität deuten darauf hin, dass YdhG tatsächlich einen starken Einfluss auf die Eisenhomöostase von *Bacillus subtilis* besitzt.

Um den Einfluss genauer zu untersuchen und die Mutante auf Siderophorproduktion zu testen, wurde der Kulturüberstand von Mutante und Wildtyp zusätzlich mit CAS-Lösung (chrome azurol S) untersucht, was zeigte, dass die $\Delta ydhG$ einen starken CAS-positiven Phänotyp besaß, auch wenn die Kultur in Vollmedium angezogen wurde (Abb. 4.35).

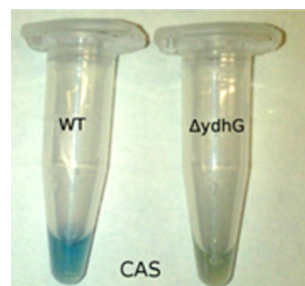


Abbildung 4.35 Liquid CAS, versetzt mit Zellkulturüberstand von Wildtyp, bzw. $\Delta ydhG$ Kultur.

Um zu überprüfen, ob es sich um Bacillibactin handelte, das den positiven CAS-Phänotyp hervorrief, wurde dieses mit Essigsäureethylester aus dem Kulturüberstand extrahiert. HPLC/MS-Analysen des Extraktes zeigten jedoch keine Spuren von Bacillibactin oder dessen Abbauprodukten.

Um die Bacillibactinproduktion anzuregen, wurden Kulturen des Wildtyps, der *ΔydhG*-Mutante und der *ΔsufU* Mutante in BOC-Minimalmedium ohne Eisen-Supplementation angezogen. Die *ΔydhG* Mutante wurde in in einer weiteren Kultur in BOC-Minimalmedium mit Zugabe von 0.1 % Hefeextrakt angezogen, um das Wachstum zu stimulieren. Die *ΔsufU* Mutante wurde mit und ohne Xyloseinduktion angezogen. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.4 wurden 100 μM (Endkonzentration) 2,2'-Bipyridyl hinzugegeben, um freies Eisen zu komplexieren und die Bacillibactinproduktion zu stimulieren. Die Kulturen wurden dann über Nacht (37 °C, 150 rpm) weiter inkubiert.

Es zeigte sich (Abb. 4.36), dass, mit Ausnahme der *ΔydhG* Mutante, alle Mutanten Bacillibactin produzierten.

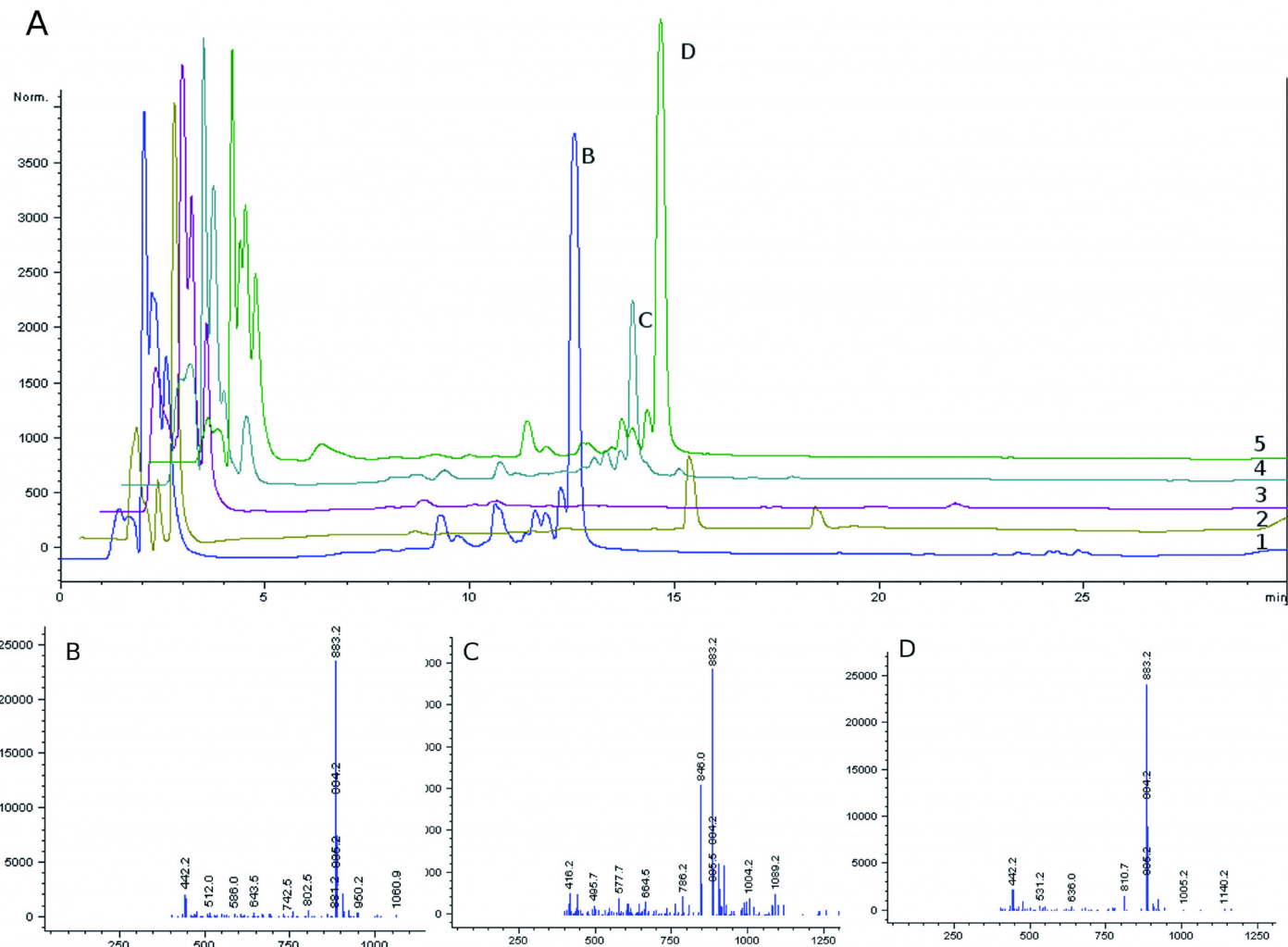


Abbildung 4.36 A: HPLC-MS Analyse des Kulturüberstandes von verschiedenen *Bacillus subtilis* Übernachtskulturen: (1) WT in BOC-MM, (2) $\Delta ydhG$ in BOC-MM (3) $\Delta ydhG$ in BOC-MM mit Hefeextrakt supplementiert (4) $\Delta sufU$ (ATCC) in BOC-MM mit Induktion durch 0.5 % (w/v) Xylose (5) $\Delta sufU$ (ATCC) in BOC-MM ohne Xylose. B,C,D: MS-Spektren der markierten Bacillibactinpeaks im HPLC-Spektrum (Bacillibactin $m/z = 883.2$).

4.4.3.4 EPR-Analyse der $\Delta ydhG$ Mutante

Da im Überstand der $\Delta ydhG$ -Mutante kein Bacillibactin nachgewiesen werden konnte, wurde getestet, ob ein eventueller Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) für den CAS-positiven Phänotyp verantwortlich sind. Dafür sollten spin-trapping EPR-Experimente durchgeführt werden. Es wurden Wildtyp, $\Delta ydhG$ und $\Delta sufU$ Mutanten in BOC-Minimalmedium angezogen und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.4 mit Dimethyl-pyrrolin-N-oxid (DMPO) versetzt (2.5 μ M Endkonzentration) und die Radikalbildung mittels EPR vermessen. Dies wurde in Kooperation mit Dr. Olaf Burghaus durchgeführt.

Es zeigte sich, dass überraschenderweise die Radikalbildung in der $\Delta ydhG$ -Mutante deutlich geringer war, als im Wildtyp. Die Radikalbildung in der $\Delta sufU$ -Mutante war in etwa auf ähnlichem Niveau, wie im Wildtyp (Abb. 4.37).

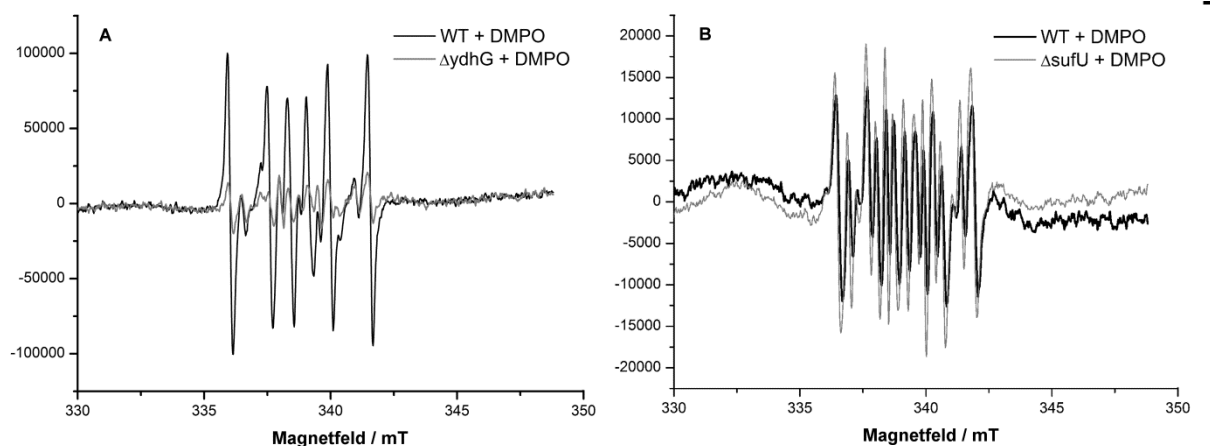


Abbildung 4.37 Spin-Trapping-EPR Experimente mit verschiedenen *Bacillus subtilis* Kulturen um die Produktion freier Radikale qualitativ zu verfolgen. A: $\Delta ydhG$ im Vergleich mit dem ATTC Wildtyp B: $\Delta sufU$ im Vergleich mit dem ATCC Wildtyp.

4.4.3.5 Eisengehalt der $\Delta ydhG$ Mutante

Um zu sehen, wie stark die Auswirkungen auf die Eisenhomöostasis sind, sollte abschließend die intrazelluläre Eisenkonzentration bestimmt werden. Dafür wurden 50 mL Übernachtskulturen des Wildtypes und der $\Delta ydhG$ Mutante pelletiert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Um Störungen durch an der Zelloberfläche gebundenes Eisen auszuschließen, wurden weitere Kontrollkulturen pelletiert und mit Wasser, sowie 5 mM EDTA in *bd.* H₂O gewaschen und getrocknet. Anschließend wurden die Zellpellets mittels ICP-MS analysiert und der Eisengehalt der Zellen bestimmt.

Tabelle 4.5 Eisengehalt getrockneter *Bacillus subtilis* Zellpellets.

Zellen	Eisengehalt
WT	$170.25 \pm 10.02 \mu\text{g Fe} / \text{mg Zellen}$
WT mit EDTA gewaschen	$121.09 \pm 1.21 \mu\text{g Fe} / \text{mg Zellen}$
$\Delta ydhG$	$202.79 \pm 1.21 \mu\text{g Fe} / \text{mg Zellen}$
$\Delta ydhG$ mit EDTA gewaschen	$148.29 \pm 9.09 \mu\text{g Fe} / \text{mg Zellen}$

Tabelle 4.5 fasst die Ergebnisse zusammen. Die Eisen-Konzentration in den $\Delta ydhG$ Zellen liegt um etwa 20 % höher als im Wildtyp, was zusammen mit den vorherigen Ergebnissen darauf hindeutet, dass die Aufnahmesysteme der Zellen intakt sind, die intrazelluläre Distribution jedoch gestört ist.

5 Diskussion

5.1 Initiale Identifizierung des Suf-Systems und YdhG

Die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern ist nicht nur ein essentieller Pfad der bakteriellen Eisenhomöostase, sondern auch der Eisenhomöostase höherer Organismen. Sie stellt einige der letzten Schritte dar, bevor der Cluster im Zielprotein eingebaut wird. Für diese wichtige Aufgabe existieren verschiedene Systeme, die selbst in unterschiedlichen Organismenreihen hochkonserviert sind: Humanes ISCU z.B. hat 75% Sequenzidentität mit *E. coli* IscU. Auch SufA bzw. IscA hat viele hochkonservierte Homologe, z.B. weist IscA, ein SufA-homologes Protein aus den Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* (Kresse), eine Sequenzidentität zu *E. coli* SufA von 54% auf. Diese Systeme sind aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeiten auch in gewissem Umfang zwischen den verschiedenen Spezies austauschbar [94]. Die Kernkomponenten der Biosynthesemaschinerien sind daher ideale Ausgangspunkte zur Identifikation der Biosynthesesysteme in anderen Organismen.

In *Bacillus subtilis* konnte durch einen BLAST mit dem *Escherichia coli* ISC- bzw. Suf-System ein Biosynthese Gencluster identifiziert werden, welcher sowohl Komponenten des ISC- als auch des SUF-Systems beinhaltet, dem Suf-System aber ähnlicher ist. Dieser Gencluster setzt sich aus den energieerzeugenden Komponenten des Suf-Systems zusammen, SufBCD sowie einer Cysteindesulfurase und einem zu IscU homologen Scaffoldprotein. Interessanterweise fehlen sowohl SufE, welches im *E. coli* Suf-System für die Aktivierung und den Sulfidtransfer der Cysteindesulfurase zuständig ist, als auch eine regulierende Komponente [79, 89].

In *E. coli* besitzt das ISC-System mit IscR einen eigenen Regulator, während das Suf-System unter der Kontrolle des Fur-Regulators und anderer globaler Stressregulatoren steht [15, 16, 77-79]. Der identifizierte Gencluster codiert weder einen eigenen Regulator, noch steht er unter Kontrolle von FUR [154]. Die Regulation der Fe/S-Cluster Biosynthese in *Bacillus subtilis* ist daher unklar, aber da es sich bei diesem Gencluster scheinbar um das einzige derartige Biosynthesesystem in *Bacillus subtilis* handelt, ist eine kontinuierliche Expression denkbar.

Ein weiterer Unterschied ist das Fehlen eines A-Typ Scaffolds. Der Gencluster besitzt lediglich ein zu IscU homologes potentiell Scaffoldprotein SufU. Es zeigt einige Ähnlichkeiten, wie die drei hochkonservierten Cysteinreste und einige Unterschiede, wie eine fehlende LPPVK-Sequenz als Chaperon-Bindungsstelle (Abb. 5.1).

```

Ec_IscU      MA-----YSEKVIDHYENPRNVGSFDNNDENVGSGMVGAPACGDVMK
Bs_SufU      MSFNANLDTLYRQVIMDHYNPRNKGVLN--DSIV-VD-MNNPTCGDRIR
              *:          * : :*:***:*** * : : * . : . *:* * : :

Ec_IscU      LQIKVNDEGIIEDARFKTYGCGSAIASSSLVTEWVKGKSLDEAQAIKN--
Bs_SufU      LTMKLD-GDIVEDARFEGEGCSISMASASMMTQAIKGKDIETALSMSKIF
              * :*: : .*:***: * : :*:***: :*: : * : : :

Ec_IscU      -----TDIAEELELPPVKIHCSILAEDAIAKAAIADYKS
Bs_SufU      SDMMQGKEYDDSIDLGDIEALQGVSKFPARIKCATLSWKALEKGVAKE--
              : : : . *.:***: * : .*: : :*.

Ec_IscU      KREAK
Bs_SufU      -EGGN
              . :

```

Abbildung 5.1 T-COFFEE [155] Alignment von *E. coli* IscU und *B. subtilis* SufU. Die konservierten Cysteinreste sind gelb markiert, die Insertion in Blau und die LPPVK-Sequenz sind rot markiert.

Neben dem Gencluster wurde ein weiteres potentiell Scaffold identifiziert: YutM, welches homolog zu SufA ist. Dieses ist nicht in einen Gencluster integriert und in dessen unmittelbarer Umgebung finden sich keine anderen Gene, die mit Fe/S-Cluster Biosynthese assoziiert werden, insbesondere keine Cysteindesulfurase, was ebenfalls darauf hindeutet, dass *B. subtilis* nur über ein abgewandeltes Suf-System verfügt und Yut. M nicht zu einem weiteren Biosynthesesystem gehört.

YutM ist jedoch ebenfalls homolog zu einem anderen so genannten A-Typ Transporter (A-type carrier, ATC) ErpA, welcher in *E. coli* essentiell für das Überleben unter aeroben Bedingungen ist [63, 64]. ErpA ist in *E. coli* ein einzelnes Gen, das abseits der bekannten Fe/S-Cluster Biosynthese Gencluster liegt und in dessen Nähe sich ebenfalls keine anderen Fe/S-Cluster-Biosynthese relevanten Gene befinden.

```

Bs_YutM      1 MS-----NEVTITTEAAALHIKDDMMKEHEEENAF LRVGVKGGGCSGLSYGMGF
Ec_SufA      1 MDMHSGTGNPQDFAWOGLTLPAAATHIRELVAKQP-GMVGVRLGVKQTGCAGFGYVLDS
Ec_ErpA      1 MSDD-----VALPLEFTDAAANKVKS LIADEDNPNLKL RVYITGGGCSGFQYGFTE
consensus    1 * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

Bs_YutM      48 EHEKSESDSVFDQHCITVLVDKESLDIMNGTVIDYKQSM LGGGFTIDNPNAIASCGCGSS
Ec_SufA      60 VSEPKDDLLEHHDGAKLFVPLQAMPFIDGTEVDFVREGLNQIFKFHNPKAQNECGCGES
Ec_ErpA      52 DDQVNEGDMTIEKQCVGLVVDPM SLQYLVGGSVDYTEGLEGSRFIVTNPNAKSTCGCGSS
consensus    61 . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *

Bs_YutM      108 FRTATNAGKPEEC
Ec_SufA      120 FG-----V
Ec_ErpA      112 FS-----I
consensus    121 * .

```

Abbildung 5.2 T-COFFEE Alignment von *Bacillus subtilis* YutM mit *E. coli* SufA und ErpA im Boxshade- Format.

Das Alignment im Boxshade-Format (Abb. 5.2) zeigt, dass die Homologie aller drei A-Typ Scaffolds sehr hoch ist. Insgesamt ist die Homologie zwischen YutM und ErpA geringfügig größer (32% Identität/ 53% Ähnlichkeit) als zwischen YutM und SufA (25% Identität/ 47% Ähnlichkeit). Möglicherweise liegt in *B. subtilis* daher ein A-Typ Transporter vom Typ ErpA anstelle eines A-Typ Scaffolds vor.

Neben SufU und YutM kommt SufB als Scaffold in Betracht, da in *E. coli* gezeigt werden konnte, dass auf SufB Eisen und ein Eisen-Schwefel-Cluster gebunden werden können und der SufBCD-Komplex mit dem SufSE komplex interagiert [43, 86, 87]. Im Gegensatz zu *E. coli* ist die Reihenfolge der Gene invertiert und SufD zeigt nur eine äußerst geringe Homologie zu *E. coli* SufD (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1 Homologien der SufBCD Proteine zwischen *E. coli* und *B. subtilis*.

Protein	Homologie zu <i>E. coli</i> oder <i>B. subtilis</i>
SufB (465 aa)	SufB (<i>E. coli</i>) I: 38% (186/477) S: 57% (274/477)
SufB (465aa)	SufD (<i>E. coli</i>) I: 31% (29/93) S: 55% (52/93)
SufB (465 aa)	SufD (<i>B. subtilis</i>) I: 27% (115/422) S: 49% (210/422)
SufC (261 aa)	SufC (<i>E. coli</i>) I: 52% (126/246) S: 73% (180/246)
SufD (437 aa)	SufB (<i>E. coli</i>) I: 24% (108/441) S: 45% (200/441)
SufD (437 aa)	SufD (<i>E. coli</i>) I: 33% (39/115) S: 61% (71/115)

Interessant ist, dass die Homologie zwischen SufB und SufD innerhalb des Systems höher ist, was in *B. subtilis* eher darauf hindeutet, dass es zwei SufB anstelle von SufB und SufD besitzt, was sich auch im T-COFFEE Alignment zeigt.

Darin zeigt sich (Abb. 5.3), dass insbesondere der C-Terminus bei allen Proteinen hoch-konserviert ist, während der N-Terminus von SufD aus *B. subtilis* eher dem von SufB gleicht. *Bacillus subtilis* besitzt also tendenziell zwei SufB anstelle SufB und SufD. Das potentielle SufD-Homologe kommt jedoch nicht als Scaffoldprotein in Betracht, da es über keine Cysteinreste innerhalb der Proteinsequenz verfügt.

Diskussion

Bs_SufB	1	MAKKMPDIGE-----YKYGFHDKDVSIFRSEGLTKETIVEEISRMKEEPQWMLDF
Bs_SufD	1	MTLGTKL-----SVDQEYLKSFSEKHQEPAWLKNL
Ec_SufB	1	MSRNTAATDDVKTWTGGPLNYKEGFTQ-LATDELAKEINEVVRATSAKRNEPEWMLDF
Ec_SufD	1	MAGLPNSSNALQQWH-----HLF-EA-EGTKRSPQ--AQQHLQQLLRTGLPTRKHENW
Bs_SufB	51	RLKSLEHFYNMPMPQWG-GDLNSLNFDEITYYVKPSERS-E-----
Bs_SufD	31	RLQALEQAEDLPMPKPDKTKITNWNFTNFAKHTVDNEPL-----
Ec_SufB	60	RLNAYRAWLEMEEPHWLKAHYDKLNYQDYSYYSAPSCGNCD--TCASEPGAVQ-----
Ec_SufD	50	KYTPLEGLINS-----QFVSTAGEISPPQRD-ALALTLDLSV----RLVFVDG
Bs_SufB	90	---RSWDEVPE---EIKQTFDKLGIPEAEQKYL--A-----GVSQAYESEVVYH
Bs_SufD	70	---SSLEDLTD---EVKALIDI---ENEDKTL-----YVQRDQTPAHL
Ec_SufB	112	-QTGANAFLSK---EVEAAFEQLGVPVREGKEV--A-----VDAIFDSVSVAT
Ec_SufD	92	RYVPAALSDATEGSGYEVSSINDRQGLPDAIQAEVFLHLTESLAQSVTHIAVKRGQRPAKP
Bs_SufB	131	NMKEDLEAQGIVFKDITDSAL-KENEDIFREHWAK-VIIPPTDNKFAALNSAVWSSGGSFIYV
Bs_SufD	104	SLSQELKDKGVIFTDILTAA-REHSDLVEKYFMKDGVKVDEHKLTALHAALVNGGAFLYV
Ec_SufB	154	TYREKLAEQGIIFCSFGEAL-HDHPELVKRYLGT-VVPGNDNFFAALNAAVASDGTFIYV
Ec_SufD	152	LILMHI-TQGVAGEEVNTAHYRHHLDLAEGAEAT---VIE-HFVSLNDAR-----
Bs_SufB	189	PKGKVKVETPLQAYFRINSENMGQFERTLIIVDEEASVHYVEGCTAPVYTTNSLHSAVVEI
Bs_SufD	163	PKNVQVETPVQAVYVHESNDTALFNHVLIVAEDHSSVTYVENYISTVNPKDAVFNIISEV
Ec_SufB	212	PKGVRCPMELSTYFRINAEKGTQFERTILVADEDSYVSYIEGCSAPVRDSYQLHAAVVEV
Ec_SufD	197	-----HFTGARFTI
Bs_SufB	249	IVKKGGYCRYTTIQNW-----ANNVYNLVTKRTVCE-ENATMEWIDGNIIGSKLTMKYPA
Bs_SufD	223	ITGDNASVTYGAVDNL-----SSGVTTYVNRGAARGRDSKIEWALGLMNDGDTISENT
Ec_SufB	272	ILHKNAEVKYSTVQNWFFPGDNNITGILNFVTKRALCEGENSKMSWTQSETGSAITWKYPS
Ec_SufD	206	NVAANAHLQHIKLAFFENPLS-----HHEFAHNDLLLA-EDATAFSSHSLGGAVLRHNTS
Bs_SufB	302	CILKGEARGMTLSIALAGKGOHQDAGAKMIHLAPNTSSTIVSKSISKQGGKVTYRGIVH
Bs_SufD	277	TNLYGDGTYGDTKTIVVVGERGEOTENFTQIIHFGKASEGYILKHGVMKDSASSIFNGIGK
Ec_SufB	332	CILRGDNSIGEFYSVALTSGHQQAADTGKMIHIGKNTKSTIISKGISAGHSQNSYRGLVK
Ec_SufD	259	TQLNGENSTLRINSILAMPVKNEVCOTRTWLEHNKGFCNSRQLHKTIIVSDKGRAVENGLIN
Bs_SufB	362	FGRKAEGARSNIECDTILIMDNKSTSOTIPYNEILNDNISLEHEAKVSKVSEEQFYLMRSR
Bs_SufD	337	TEHGASKANAEQESRVLMSEKARGDANPILLIDEDDVTAGHAASVGRVDPIQLYYLMRSR
Ec_SufB	392	IMPTATNARNFTQCDSSMLIGANCGAHTFPYVECRNNSAQLEHEATTSRIGEDQLFYCLQR
Ec_SufD	319	VAQHAIKTDGQMTNNNLLMGKLALEVDTKPKQLEIYADDVKCSHGATVGRIDDEQIFYLRSR
Bs_SufB	422	GISEEEATEMIVMGFIEPFTKELPMFYAVEMNRLIK--FEMEGSIG
Bs_SufD	397	GIPKEEAERLVIYGFLLAPVVNELPTEGV-KKQLV---SVIERKVK
Ec_SufB	452	GISEEDAISMIVNGFCKDVFSELPLEFAVEAQKLLA--ISLEHSVG
Ec_SufD	379	GINQQDAQQMIIYAFAAELTEALRDEGL-KQQVLARIGQRLPGGAR

Abbildung 5.3 T-COFFEE Alignment im Boxshade-Format von *B. subtilis* SufB und SufD mit *E. coli* SufB und SufD.

In den meisten Bakterien liegt das Suf-System als Backup-System für Stressbedingungen vor [77, 78, 156]. Py, et al. merken an, dass bei *B. subtilis* eine Redundanz im Gencluster vorliegen könnte und spekulieren, ob der Suf-Gencluster möglicherweise zwei Systeme beherbergt: SufSU als „house-keeping“ System und SufBCDS als Backup-System für Oxidativen Stress [45]. Diese Sicht kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit insoweit gestärkt werden, dass SufSU in vitro zur Fe/S-Beladung von CitB führten. Möglicherweise besitzt SufBCD in vivo jedoch auch eine stabilisierende Funktion und das System unterscheidet sich stärker vom *E. coli* Suf-System als angenommen.

Hinweise auf eine entsprechende Funktion liefern Untersuchungen der Transkriptome und Proteome von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus anthracis* unter oxidativen Stressbedingungen [157, 158]. Hier wurde gefunden, dass der Suf-Gencluster unter oxidativen Stressbedingungen induziert wird. In *Bacillus licheniformis* fand dabei auch auf Proteomebene eine signifikante Induktion von SufC und SufD statt, was einen potentiellen Einfluss des SufBCD-Komplexes bei oxidativem Stress wahrscheinlich erscheinen lässt.

In gram-positiven Bakterien scheint sich, im Gegensatz zu gram-negativen Bakterien, das Suf-System mit dem U-Typ Scaffold SufU als Hauptsystem durchgesetzt zu haben, da eine ähnliche Maschinerie z. B. auch in *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, Mycobakterien und anderen Pathogenen und nicht Pathogenen zu finden ist (Abb. 5.4) [54, 159, 160].

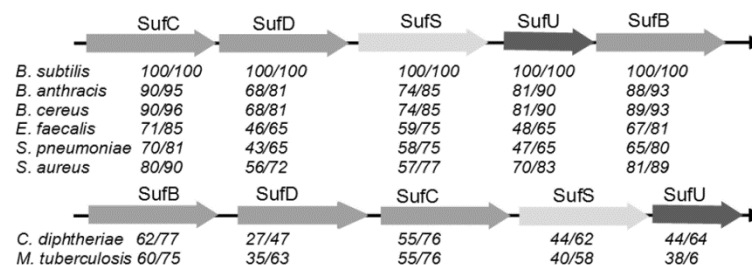


Abbildung 5.4 Suf-Systeme in anderen Gram-positiven Organismen und ihre Homologie (Identität/Ähnlichkeit) mit dem *Bacillus subtilis* Suf-System.

In allen diesen Fällen findet sich ein U-Typ-Scaffold in einer Suf-artigen Biosynthese Maschinerie, in welchen jedoch ein SufE und ein A-Typ Transporter fehlt. Bisher konnte kein System identifiziert werden, in dem sowohl ein SufU als auch ein SufE vorkamen, was auf Trennung in den Evolutionswegen dieser Systeme hindeutet. Gleichzeitig zeigt dies, dass alle Hauptsysteme zur Fe/S-Cluster-Biosynthese über ein U-Typ Scaffold verfügen, was darauf hinweist, dass U-Typ Scaffolds die essentielleren Scaffolds für die Biosynthese darstellen und die unmittelbare Cluster Biosynthese auf diesen stattfindet und erst dann ein möglicher weiterer Transport durch einen A-Typ Transporter geschieht. Zentral für diese Arbeit war daher zunächst die Untersuchung des Einflusses von SufU und des potentiellen A-Typ-Transportes YutM.

Im Gegensatz zu den hochkonservierten Komponenten des Suf-Systems von *Bacillus subtilis* ist das Frataxinhomologe YdhG nicht sequenzhomolog zu Frataxin oder seinen Homologen aus *E. coli* oder anderen Organismen. Es konnte als strukturhomologes Protein identifiziert

werden und stellt vermutlich ein funktionshomologes Protein dar [122]. YdhG selbst besitzt einige Homologe in anderen Organismen.

Tabelle 5.2 Homologe zu YdhG in anderen Organismen.

Organismus	Identität/Ähnlichkeit der aa in %
<i>Bacillus subtilis</i>	100/100
<i>Paenibacillus vortex</i> V453	69/83
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	69/80
<i>Dethiobacter alkaliphilus</i> AHT 1	70/82
<i>Listeria ivanovii</i> FSL F6-596	60/81
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	53/68
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	50/64
<i>Listeria monocytogenes</i>	56/76

Interessanterweise zeigt sich bei der Suche nach Homologen von YdhG, dass YdhG als Frataxin nicht explizit an ein einzelnes Suf-System gekoppelt ist. So besitzen *Staphylococcus aureus* oder *Bacillus anthracis* wie *Bacillus subtilis* nur ein Suf-System, aber keine sequenzhomologen Proteine zu YdhG oder CyaY. Die bakterielle Eisenhomöostase scheint daher deutlich vielschichtiger und bedarf weiterer Untersuchungen.

Einen anderen Weg, das potentielle Frataxin zu finden und identifizieren, zeigt die native 2D-Proteomanalyse auf. In dieser konnte YdhG in einer Fraktion isoliert werden, in welcher die Eisenkonzentration mit der YdhG-Proteinkonzentration korreliert werden konnte, während die anderen Proteine in dieser Fraktion nicht als eisenbindend bekannt waren, was zumindest auf Eisenbindung in vivo hindeutet und eine mögliche Kopplung des Eisens an seine Funktion.

5.2 Charakterisierung der Kernkomponenten der Fe/S-cluster Biosynthese

5.2.1 Analyse der potentiellen Scaffoldproteine SufU und YutM

5.2.1.1 In vivo Untersuchung von SufU und YutM

Die bioinformatischen Untersuchungen legen nahe, dass in *Bacillus subtilis* lediglich ein Suf-System für die Fe/S-Cluster Biosynthese vorliegt. Ein eventuelles alternatives Scaffold Protein lag mit YutM als Homologem zu SufA vor. Die Deletion zeigte zum einen, dass eine reine SufU-Deletionsmutante nicht lebensfähig ist, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen

aus der Literatur steht [143]. Eine Deletion des SufA Homologen hingegen war direkt möglich, woraus geschlossen werden kann, dass es sich nicht um ein essentielles Gen handelt bzw. dass, sollte es sich um einen Bestandteil der Fe/S-Cluster Biosynthesemaschinerie handeln, für dieses Protein Backupssysteme vorhanden sein müssen. Dies ist bereits ein Unterschied zu *E. coli* ErpA, dessen Deletion unter aeroben Bedingungen letal ist [63, 64].

Auch die Konditionalmutante von SufU zeigte, dass die Repression von SufU letal war. Die Mutante wuchs ohne Induktion in Minimalmedium nur sehr schwach bis gar nicht an, während sich in LB-Medium ebenfalls ein verringertes Wachstum zeigte.

Im Gegensatz dazu zeigte die *yutM* Deletionsmutante keinen Phänotyp in BOC-Minimalmedium oder LB-Medium. Anstelle verringerten Wachstums scheint das Wachstum zum Teil sogar geringfügig stärker zu sein. Auch unter Eisenmangelbedingungen konnte kein verringertes Wachstum festgestellt werden. Das gleiche wurde für Minimalmedium ohne Glutamat gefunden, was dafür spricht, dass die Enzyme des Krebszyklus (insbesondere Aconitase) von YutM unabhängig sind.

Auch die Untersuchung der Proteinaktivität im Zellextrakt der Mutanten zeigt deutliche Unterschiede. So ist die Aktivität der getesteten Eisen-Schwefel-Proteine im Zellextrakt der Δ *sufU*-Mutante drastisch reduziert, während in der Δ *yutM*-Mutante quasi keine Veränderung nachzuweisen ist. Hieraus lässt sich ableiten, dass YutM keine Scaffoldfunktionen in *Bacillus subtilis* wahrnimmt und SufU nicht ersetzen kann. SufU scheint daher das einzige essentielle Scaffoldprotein in *B. subtilis* zu sein. Die Existenz eines weiteren bisher unbekannten Fe/S-Biosynthesesystems kann nicht ausgeschlossen werden, aber aufgrund der Letalität der Δ *sufU*-Mutante als unwahrscheinlich angenommen werden.

Auch der Vergleich mit *E. coli* deutet darauf hin, dass SufU das einzige Scaffold in *B. subtilis* ist. *E. coli* zeigt bei der Deletion eines einzelnen Scaffoldproteins keinen so starken Phänotyp. Die einzelne Deletion von *iscA*, *iscU* oder *sufA* zeigt keinen letalen Phänotyp, während die Deletion von *iscA/sufA* dazu führt, dass die Mutante nur unter anaeroben Bedingungen wachsen kann [62]. Eine Deletion von *iscSUA* führt zu einem letalen Phänotyp, welcher aber durch die Addition von Nikotinsäure und Thiamin zu Minimalmedium aufgehoben werden kann und im Wesentlichen mit der Deletion von IscS zusammen hängt (Tabelle 5.3) [74].

Tabelle 5.3 Letalität der Deletionen von Scaffoldproteinen.

Spezies	Mutante	Phänotyp
<i>B. subtilis</i>	ΔsufU	letal
<i>B. subtilis</i>	ΔyutM	nicht letal
<i>E. coli</i>	ΔiscU	nicht letal
<i>E. coli</i>	ΔiscA	nicht letal
<i>E. coli</i>	$\Delta\text{iscA } \Delta\text{sufA}$	letal unter aeroben Bed.
<i>E. coli</i>	ΔiscSUA	letal, aufgehoben durch Thiamin- und Nicotinsäure-supplementation

Alle Ergebnisse deuten darauf hin, dass in *Bacillus subtilis* und den Homologen, die nur über eine SufU-lastige Fe/S-Cluster Biosynthese verfügen, im Gegensatz zu *E. coli* die A-Typ Transporter keine entscheidende Rolle spielen und für die Biosynthese nicht benötigt werden. Dies zeigt sich im Besonderen daran, dass das SufA/ErpA Homologe YutM im Gegensatz zu *E. coli*, wo die Deletion unter aeroben Bedingungen letal ist [63], hier keinen Phänotyp zeigt. Die Existenz weiterer Fe/S-Cluster Biosynthesesysteme kann auch in *Bacillus subtilis* nicht ausgeschlossen werden, aber diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei dem Homologen des Suf-Systems um das „House-keeping“-System handelt und mögliche weitere Systeme nur unter sehr speziellen Bedingungen exprimiert werden.

5.2.1.2 Clusterrekonstitution und Clustertransfer von SufU

Nachdem festgestellt wurde, dass SufU eine essentielle Rolle im Stoffwechsel von *Bacillus subtilis* spielt, musste gezeigt werden, dass SufU *in vitro* die Kriterien eines Scaffold-Proteins erfüllt. Dies sind zum einen: Die Fähigkeit einen Eisen-Schwefel-Cluster zu binden und diesen darüber hinaus auf andere Proteine zu transferieren.

Das erste Kriterium konnte durch chemische Rekonstitution erfüllt werden. Dabei konnte ein Fe/S-Cluster rekonstituiert werden, der im UV/Vis-Spektrum alle spektroskopischen Merkmale eines [4Fe-4S]-Clusters aufweist. Der Clustertyp konnte jedoch nicht mit anderen spektroskopischen Methoden charakterisiert werden, da der Fe/S-Cluster kein EPR-Signal zeigte, bzw. SufU in den Konzentrationen, welche für Mössbauer-Spektroskopie erforderlich wären, präzipitierte.

Auch mit der Variante SufU_D43A, die den Cluster analog zu anderen IscU-Proteinen stabilisieren konnte, war es nicht möglich, ein EPR-Spektrum aufzuzeichnen [51, 54, 145,

146, 161]. Diese Mutante war dabei deutlich instabiler und präzipitierte trotz gebundenem Cluster sehr schnell. Das UV/Vis-Spektrum des frisch gereinigten SufU_D43A zeigt sowohl Andeutungen für [2Fe-2S]-Cluster als auch [4Fe-4S]-Cluster, konnte aber keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden. Vergleichbares wurde für IscU_D39A aus *A. vinelandii* gefunden [58]. Die Analyse des Eisen- und Sulfidgehalts des Proteins nach Aufreinigung ergab nur sehr geringe Mengen an Eisen und Sulfid, so dass von einer unvollständigen Rekonstitution ausgegangen werden kann. Rekonstituiertes SufU_D43A zeigte jedoch das Spektrum eines [4Fe-4S]-Clusters, ohne Hinweise auf andere Fe/S-Spezies.

Die Tatsache, dass im Wesentlichen nur Hinweise auf [4Fe-4S]-Cluster gefunden wurden, welcher vermutlich in einem SufU-Dimer gebunden ist, ist eine weitere Besonderheit des SufU-Scaffolds, da NifU und IscU schrittweise beladen werden können [39, 40, 56]. So durchlaufen die anderen U-Typ-Scaffolds mehrere Clusterzustände: 1. Einen [2Fe-2S]-Cluster auf einem Monomer. 2. Zwei [2Fe-2S]-Cluster auf einem Dimer und abschließend eine reduktive Kupplung zu 3. Einen [4Fe-4S]-Cluster auf einem Dimer (siehe Abb. 5.5) .

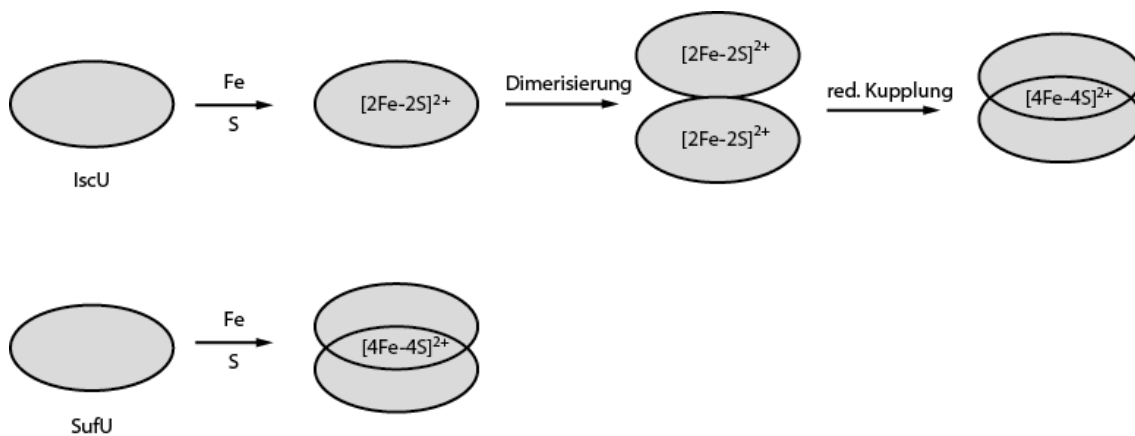


Abbildung 5.5 Sequenzieller Aufbau eines [4Fe-4S]-Clusters auf IscU im Vergleich zum direkten Aufbau eines [4Fe-4S]-Clusters bei SufU.

Abgesehen von dem potenziellen Clustermischtyp auf nahezu unbeladenem SufU_D43A konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Hinweis auf einen eventuellen [2Fe-2S]-Cluster gefunden werden. Auch Rekonstitutionen mit verminderten Eisen- und Sulfidmengen führten stets zum charakteristischen UV/Vis-Spektrum eines [4Fe-4S]-Clusters. Ein entsprechendes Verhalten wurde ebenso für SufU aus *Enterococcus faecalis* entdeckt [162]. Dies deutet darauf hin, dass dies typisch für SufU und seine Homologen aus dem *Firmicutes* Phylum ist.

5.2.1.3 Metallinduzierte Proteinstabilisierung

Nach den bisherigen Erkenntnissen scheint SufU das einzige Scaffoldprotein in *Bacillus subtilis* zu sein. Es ist dabei interessant, dass sich im gereinigten Protein kein Eisen findet, sondern Zink. Ähnliches wurde für IscU aus *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pyogenes* gefunden, welches nach Reinigung im Wesentlichen Zink an der Eisen-Schwefel-Cluster Bindungsstelle gebunden hatte [55, 163]. Im Falle von *H. influenzae* IscU wurde das Zink in der NMR-Struktur identifiziert, während es sich bei *S. pyogenes* in der Kristallstruktur fand. Dabei wurde auch nur gebundenes Zink gefunden, wenn IscU in Minimalmedium mit 8.3 μM ZnSO_4 und 59.9 μM FeCl_3 exprimiert wurde (*H. influenzae*). Auch hier wurde jedoch IscU unter aeroben Bedingungen exprimiert und gereinigt. Möglicherweise ist die Eisenbindung von IscU/SufU bei heterologer Expression beeinträchtigt oder empfindlich gegenüber Sauerstoff.

Die CD-spektroskopischen Experimente zeigten, dass die Zugabe von EDTA, welches das Zink komplexiert, das Protein drastisch destabilisiert. Dies konnte auch für *H. influenzae* IscU gezeigt werden, wo bei EDTA Zugabe einige ^1H - ^{15}N HSQC-NMR Kreuzpeaks verschwanden oder die Intensität deutlich reduziert wurde, was darauf hindeutet, dass das Zink für die Struktur von IscU und vermutlich auch von SufU essentiell ist. Das gleiche wurde von Kornhaber et. al. auch für *Bacillus subtilis* IscU gefunden [55, 147].

Auch die Tatsache, dass die spezifische Aktivität von SufS vermindert wird, wenn in der Reaktionsmischung EDTA vorliegt, deutet darauf hin, dass die Struktur durch den Verlust des Zinks beeinträchtigt wird und die Interaktion mit SufS erschwert wird.

Sicher kann daraus jedoch nur gesagt werden, dass für die Stabilität von SufU die Metallbindung an der Bindungsstelle essentiell ist. Welches Metall *in vivo* in die Komplexbildung involviert ist, bleibt unklar. *In vitro* konnte nur Zink nachgewiesen werden, sofern die Proteine ohne Eisen-Schwefel-Cluster gereinigt wurden [55, 147, 163].

Möglicherweise ersetzt Zink in dieser Konfiguration Eisen, was es erleichtern würde, zu spekulieren, ob die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese in diesem Falle dem sogenannten „Fe-first, S-second“ Mechanismus folgt, also zunächst das Metall Fe an SufU gebunden wird. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass auch intrazellulär die Struktur durch Zink stabilisiert wird und das Eisen erst nach dem Transfer des Sulfides auf SufU übertragen wird. Daher kann dieser Befund nicht als Beleg für den einen oder anderen Mechanismus dienen.

Eine alternative Hypothese ist, dass die Zink-Bindung ein Relikt aus früheren Evolutionsstufen ist, wo anstelle von Eisen-Schwefel-Clustern Zink-Schwefel-Cluster existierten [164], so dass die Zink-Bindung ursprünglich bevorzugt wurde und erst in der Biosynthese des Fe/S-Clusters durch Eisen ausgetauscht wird.

Generell zeigt die NMR-Struktur, dass die drei Cysteinreste eine tetraedrische Koordination des Zn^{2+} -Ion begünstigen und ein weiterer Rest erforderlich ist, um diese zu schließen. (Abb. 5.7)

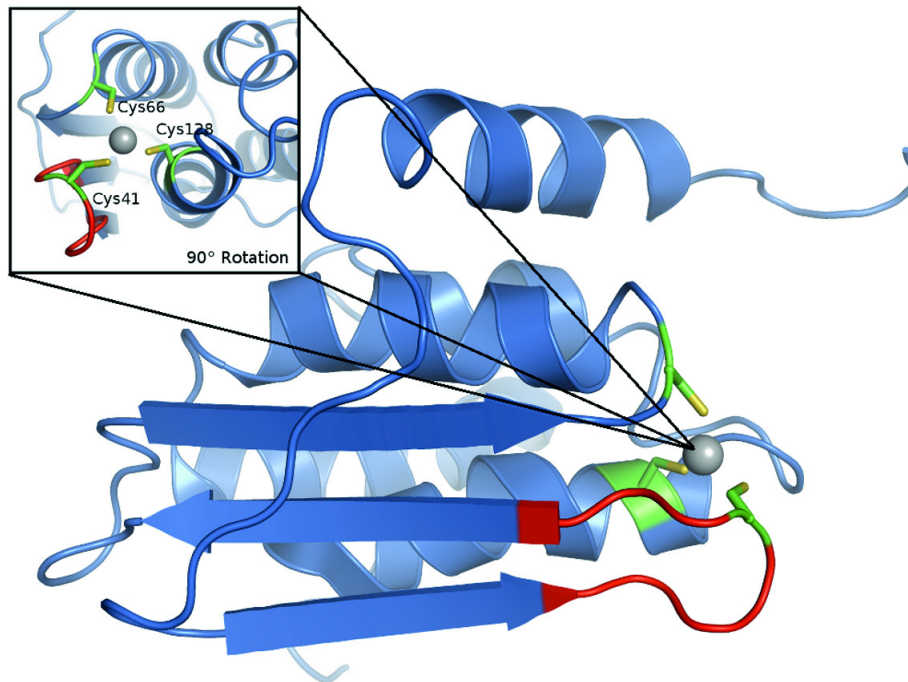


Abbildung 5.6 NMR-Struktur von SufU (PDB: 2AZH) mit Zoom auf die Eisen-Schwefel-Cluster Bindungsstelle.

Insgesamt sind die Cysteinreste 66 und 128 in der Struktur eher unflexibel, während Cys41 eine so große Flexibilität besitzt, dass sogar der Carbonyl-Sauerstoff in die Koordination des Zn^{2+} miteinbezogen werden kann, wie sich in den Minimalenergiestrukturen aus dem NMR zeigt (Abb. 5.8). Dabei zeigt sich, dass die Cysteine 66 und 128 ihre Position nur minimal variieren, während sich Cystein 41 relativ weit bewegt. Auch die Sekundärstrukturen, in denen Cys66 und Cys128 liegen, zeigen keine großen Variationen, während der Loop, in dem Cys41 liegt (rot in Abb. 5.8), ebenfalls sehr flexibel ist.

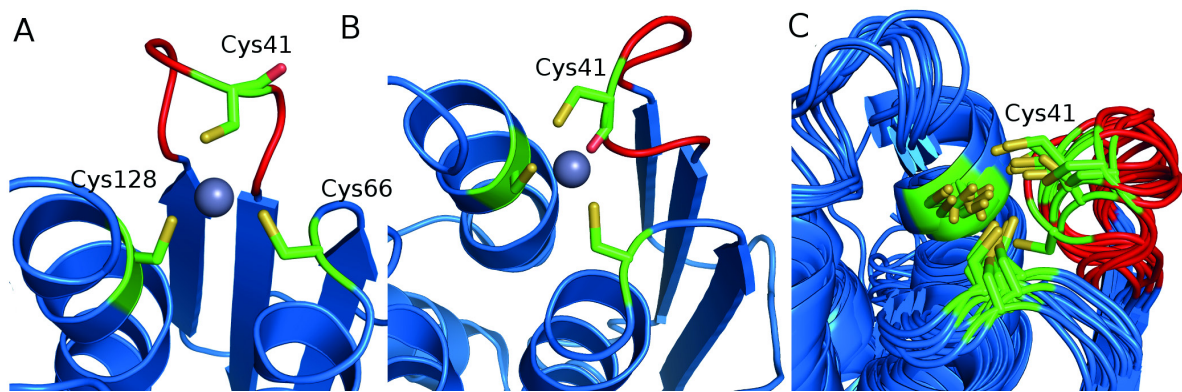


Abbildung 5.7 Flexibilität der Cysteinreste innerhalb der Eisen-Schwefel-Cluster Bindungsstelle.

Diese starke Flexibilität des Cystein 41 ist auch eine mögliche Erklärung für die geringere Stabilität der SufU-Varianten: Fehlt ein Cysteinrest, kann das Zink nicht mehr effizient gebunden werden, wodurch die Zugabe von EDTA zu einer starken Destabilisierung des Proteins führt. Darüber hinaus ist die Flexibilität des Cystein 41 essentiell für die Interaktion zwischen SufU und SufS (siehe 5.2.2.2).

5.2.2 Die Cysteindesulfurase SufS

5.2.2.1 Kinetische Charakterisierung von SufS

Die Cysteindesulfurase SufS stellt den Sulfid-Donor der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese dar. Die Aktivierung und der Transfer des Sulfids sind essentielle Schritte auf dem Weg der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese. SufS aus *Bacillus subtilis* ist wie seine Homologen IscS und SufS aus *E. coli* und anderen Organismen ein Pyridoxal-5'-Phosphat abhängiges Enzym, das die Umsetzung von Cystein zu Alanin katalysiert und das Sulfid dabei intramolekular als Persulfid auf ein Cystein überträgt [31, 32]. SufS selbst liegt als Dimer vor und führt seine Funktion auch als Dimer aus.

Cysteindesulfurasen zeigen dabei ein recht unterschiedliches Verhalten. Die bisherigen Untersuchungen legen nahe, dass IscS aus *E. coli* und seine Homologen eine hohe Basalaktivität besitzen und nur geringfügig aktiviert werden, während SufS einen Aktivator benötigt [28, 35, 43, 86]. *Bacillus subtilis* SufS besitzt jedoch kein SufE, welches in *E. coli* SufS aktiviert und als erster Sulfid-Akzeptor fungiert [80, 89]. In *E. coli* ist es noch umstritten, ob anschließend das Sulfid auf SufA oder SufB des SufBCD Komplexes transferiert wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass SufBCD die Aktivität der Cysteindesulfurase steigert und Sulfid auf SufB transferiert werden kann.[43, 86] In *Bacillus*

subtilis hingegen zeigte sich, dass SufS direkt von SufU aktiviert wird und dabei eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 40 erreicht.

Tabelle 5.4 Aktivierung der Cysteindesulfurasen verschiedener Organismen.

Cysteindesulfurase	Aktivierung
NifS (<i>A. vinelandii</i>) (Typ I)	keine Aktivierung, gleichbleibende Aktivität
IscS (<i>E. coli</i>) (Typ I)	schwache Aktivierung durch IscU (Faktor 6)
SufS (<i>E. coli</i>) (Typ II)	schwache Aktivierung durch SufE, starke Aktivierung durch SufE und SufBCD
SufS (<i>B. subtilis</i>) (Typ II)	starke Aktivierung durch SufU
SufS (<i>E. faecalis</i>) (Typ II)	starke Aktivierung durch SufU

Weitere Analysen zeigten, dass die Aktivität von SufS direkt von der Cystein- und der SufU-Konzentration abhängt. Dabei zeigte sich in beiden Fällen ein Michaelis-Menten-artiger Verlauf der Aktivität, wenn jeweils ein Parameter konstant gehalten wurde. Da SufS als Dimer vorliegt und daher 2 Cystein und 2 SufU Monomere pro Dimer bindet, ist eine Analyse nach Hill ebenfalls möglich. Wurde der Verlauf der Aktivität mittels Hill-Plot analysiert, zeigten sich Hinweise auf ein kooperatives Verhalten im Reaktionsmechanismus. So ergab sich ein SufU-spezifischer Hill-Parameter von 1.37, was auf eine positive Kooperation hindeutet, also die Bindung eines SufU-Monomers die Bindung eines zweiten Monomers begünstigt. Im Gegensatz dazu ergab sich ein Cystein-spezifischer Hill-Parameter von 0.61, was auf eine negative Kooperation hindeutet, die Bindung eines Cysteins also tendenziell die Bindung eines weiteren Cysteins erschwert. Die Hill-Parameter kompensieren sich jedoch in diesem Falle, so dass die SufU- und Cysteinbindung entsprechend der K_M -Werte ausgeglichen wird.

Diese ersten kinetischen Hinweise passen zu einem Bedarf dieser Proteine unter potenziellen Stresssituationen, so kann unter Eisenmangel oder oxidativem Stress, durch den ein hoher Bedarf an Eisen-Schwefel-Proteinen besteht, durch eine Steigerung der SufU-Expression eine schnellere und effiziente Cluster Biosynthese und ein schnellerer Transfer erreicht werden. Im Gegenzug kann unter Nährstoffmangelbedingungen durch verringerte Cysteinkonzentrationen die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese verringert werden und so wertvolle Ressourcen (sowohl Eisen als auch Cystein) gespart werden oder eine unspezifische Sulfidbindung verhindert werden, welche bei einem ungünstigen hohen intrazellulären Cystein:SufU-Verhältnis auftreten könnte.

Im Gegensatz zu *apo*-SufU ist *holo*-SufU nicht in der Lage SufS zu aktivieren, was ebenfalls als eine Art Schutz der Zelle verstanden werden kann. So bedeuten hohe Konzentrationen an *holo*-SufU einen geringen Bedarf an Eisen-Schwefel-Clustern und eine reduzierte Aktivität von SufS schützt in diesem Falle die Zelle vor der Freisetzung von toxischem Sulfid.

Ähnliche Ergebnisse wurden für SufE und SufS aus *Erwinia chrysanthemi* gefunden. Dort folgt die Aktivität von SufS nach Aktivierung durch SufE einem sigmoidalem Verlauf [80]. Für *Bacillus subtilis* wurden die kinetischen Ergebnisse unabhängig von uns von Selbach *et. al.* gefunden und publiziert [148].

Tabelle 5.5 Kinetische Parameter von SufS.

Parameter	Diese Arbeit		Selbach <i>et. al.</i>	
	SufU	Cys	SufU	Cys
$K_M / \mu\text{M}$	2.63 ± 0.48	49.71 ± 15.81	3.0 ± 0.3	86 ± 1
$v_{\text{max}} / \text{mU/mg}$	93.38 ± 9.68	153.54 ± 11.59	n.d.	1157 ± 132
$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	0.155 ± 0.016	0.255 ± 0.007	n.d.	0.87

Die Werte liegen in beiden Messungen in einem ähnlichen Wertebereich, zeigen jedoch trotzdem deutliche Unterschiede. Vermutlich liegt dies am His-Tag, der die Interaktion zwischen SufU und SufS beeinträchtigt und daher vermutlich auch einen Einfluss auf die Reaktionskinetik hat.

Schlussendlich wurde untersucht, welchem Mechanismus die Reaktion folgt. Dabei zeigte sich, dass es sich um einen Ping-Pong Bi-Bi Reaktionsmechanismus handelt. Die Daten deuten darauf hin, dass zunächst in einem ersten Schritt das Sulfid aus Cystein auf SufS übertragen wird, vermutlich auf das Cystein41, bevor die Interaktion mit SufU beginnt. Im Anschluss wird das als Persulfid gebundene Cystein auf SufU übertragen. Hierbei spielen die SufU Cysteinreste eine wichtige Rolle (s. unten).

Ein wichtiger Punkt ist, dass Sulfid allein auf SufU unter den Reaktionsbedingungen (DTT) nicht stabil ist und als Sulfid freigesetzt wird. Dadurch wird die Aktivität von SufS deutlich erhöht, da immer ausreichend unbeladenes SufU vorhanden ist, wodurch es aktiviert wird. Dies stellt die Bedingungen *in vivo* jedoch nur unzureichend nach, so dass *in vivo* deutliche Einschränkungen bezüglich der Aktivität zu erwarten sind, welche jedoch unter Umständen durch die positive Kooperation in Bezug auf SufU aufgehoben werden könnte.

5.2.2.2 Interaktion von SufS und SufU

Die Interaktion zwischen SufS und SufU basiert maßgeblich auf den Cysteinresten 41, 66 und 128 von SufU. Die Untersuchungen zeigen, dass keine SufU-Variante in der Lage ist, SufS über Basalaktivität hinaus zu aktivieren. Dies konnte ebenfalls für SufU aus *Enterococcus faecalis* gezeigt werden [162]. Wenn die Varianten mit Wildtyp SufU um SufS konkurrierten, zeigt sich jedoch, dass die Varianten Cys66Ala und Cys128Ala keinen Einfluss auf die Aktivität von SufS haben. Dies deutet darauf hin, dass diese beiden Varianten nicht mit SufS interagieren. Dies zeigt sich auch in den Pull-Down Assays oder bei der Gelfiltration. Die Ergebnisse der Gelfiltrationsexperimente müssen allerdings vorsichtig interpretiert werden, da Selbach *et al.* zeigten, dass die Stabilität der Interaktion von SufS und SufU durch die His-Tags der rekombinanten Proteine gestört wird [148].

Eine bessere Aussagekraft haben in diesem Zusammenhang die Pull-down Experimente, bei denen SufU an Ni-NTA immobilisiert wurde und natives SufU aus dem Zellextrakt einer Expressionskultur gefischt wurde. Hierbei zeigte sich, dass lediglich der Wildtyp und die Variante Cys41Ala in der Lage sind, mit SufS eine hinreichend stabile Interaktion aufzubauen.

Im Gegensatz zu den Varianten Cys66Ala und Cys128Ala ist die Variante Cys41Ala nicht nur in der Lage mit SufS zu interagieren, darüber hinaus inhibiert sie SufS sehr effizient. Die Aktivität von SufS ist unabhängig von einem Überschuss an Wildtyp SufU bereits bei einem 1:1 Verhältnis von SufS zu SufU_C41A drastisch reduziert. Die sehr niedrige Inhibitionskonstante von 41 nM spricht dafür, dass es sich um eine tight-binding Inhibition handelt. Auch die Tatsache, dass in den Gelfiltrationsexperimenten eine stabile Interaktion zwischen SufU_C41A und SufS gefunden wurde, deutet darauf hin, dass diese Variante eine äußerst stabile Interaktion ausbildet, die nicht durch den His-Tag gestört wird.

Interessanterweise findet sich der genau gegenteilige Einfluss bei *Azotobacter vinelandii* IscU und IscS. So konnte gezeigt werden, dass die Varianten IscU_C63A und IscU_C106A mit IscS interagieren und einen Komplex bilden, während die Variante IscU_C37A dazu nicht mehr in der Lage war [47]. Dies konnte durch massenspektroskopische Analysen der Komplexe gezeigt werden. Der Einfluss der einzelnen Varianten auf die Aktivität von IscS wurde dabei nicht untersucht, so dass kein vollständiger Vergleich möglich ist.

Diese massenspektroskopischen Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Kato *et al.*, welche fanden, dass zwischen IscU und IscS aus *E. coli* eine kovalente Bindung ausgebildet wird, an welcher vermutlich Cys63 aus SufU beteiligt ist. Sie fanden ebenfalls, dass IscS durch IscU aktiviert wird, aber in weit weniger starkem Maße (Faktor 6) als SufS durch SufU aktiviert wird (Faktor 40) [48].

Es ist noch unklar, ob tatsächlich eine kovalente Bindung ausgebildet wird und welche Cysteine daran beteiligt sind. Im Fall von SufS aus *Bacillus subtilis* kann man nach diesen Ergebnissen eine kovalente Bindung weder ausschließen noch bestätigen.

Generell wurden die meisten Cysteindesulfurasen, im besonderen IscS und NifS bisher nicht ausführlich kinetisch charakterisiert. Die beste kinetische Charakterisierung einer an Fe/S-Cluster Biosynthese beteiligten Cysteindesulfurase ist SufS aus *E. coli*, welche nur eingeschränkt vergleichbar ist, da diese durch SufE und den SufBCD Komplex aktiviert wird. Dabei wird das Sulfid zunächst auf SufE übertragen und anschließend auf SufB, welches vermutlich als Scaffold-Protein fungiert. SufA scheint hingegen SufS nicht zu aktivieren. Viele kinetische Untersuchungen verwenden auch Selenocystein, da dieses leichter deseleniert werden kann, aber die Ergebnisse sind nur eingeschränkt vergleichbar [28, 35].

Zwischen den Cysteindesulfurasen des *E. coli* Suf-Systems und des *B. subtilis* Suf-Systems scheint es deutlichere Unterschiede zu geben, da die anscheinend für die Interaktion wichtigen Cysteinreste vertauscht sind.

Im Falle des hier charakterisierten SufS aus *Bacillus subtilis* können wir aus den Daten schließen, dass vermutlich die Cysteine 66 und 128 von SufU für die Erkennung durch die Cysteindesulfurase wichtig sind oder SufU durch das Fehlen eines dieser beiden Reste strukturell so stark destabilisiert wird, dass es nicht mehr mit der Cysteindesulfurase interagieren kann. Da bei Zugabe von EDTA zur Reaktionsmischung, die Aktivität von SufS ebenfalls reduziert wird, kann man davon ausgehen, dass die strukturelle Stabilität von SufU für die Interaktion essentiell ist.

Cystein 41 scheint hingegen für den Sulfidtransfer erforderlich zu sein, daher kann man annehmen, dass das Persulfid auf der Cysteindesulfurase zunächst auf dieses Cystein übertragen wird, was auch die Inhibition von SufS durch diese Variante erklären würde. So ist es möglich, dass die Cysteine nach und nach beladen werden, jedoch Cystein 41 als Sulfid-Akzeptor dient. Ist die Übertragung des Sulfides auf Cystein 41 nicht möglich, stoppt die

Reaktion. Da die Interaktion zwischen SufU und SufS stabil ist, ist die Dissoziationskonstante des Komplexes verringert.

Wodurch die Stabilität des Komplexes zustande kommt, kann nicht eindeutig geklärt werden. Da die Varianten SufU_C66A und sufU_C128A nicht mit SufS interagieren, scheint eine kovalente Bindung auszuschließen zu sein. Möglicherweise findet die Interaktion über das gebundene Metallion statt, so dass SufS die freie Bindungsstelle des Zink-Ions besetzen kann und die tetraedrische Koordination komplettiert. Da Cystein 41 flexibel in der Struktur ist (Siehe Abb. 5.7) und auch der Carbonyl-Sauerstoff der Aminosäure das Zink-Ion koordinieren kann (siehe Abb. 5.7 B), wäre die Bindung trotz des fehlenden Cysteins weiterhin möglich, so dass unter Umständen ein stabiler Komplex gebildet werden kann, in dem das Zink von dem Carbonyl-Sauerstoff des Restes 41 und den Cysteinen 66 und 128 gebunden wird sowie von einem weiteren Rest von SufS, welcher noch identifiziert werden muss.

5.2.2.3 Mechanismus des Sulfidtransfers von SufS auf SufU

Auf Basis der präsentierten Daten wurde folgendes Modell für den Mechanismus des Sulfidtransfers zwischen SufS und SufU entwickelt (Abb. 5.8).

(1) *Apo*-SufS wird zunächst durch die PLP-abhängige Desulfurierung von Cystein mit einem Persulfid beladen. Anschließend wird (2) eine vermutlich nicht kovalente Interaktion zwischen SufS und SufU aufgebaut, welche wahrscheinlich auf den Cysteinen 66 und 128 von SufU basiert. Dann wird (3) das Persulfid von SufS auf Cystein 41 von SufU übertragen. Cystein 41 sitzt auf einem flexiblen Loop (siehe Abb. 5.7) und ist daher vermutlich in der Lage, mit dem Persulfid auf SufS in Kontakt zu treten und das Persulfid zu übernehmen. Nach dem intermolekularen Sulfidtransfer löst sich der Komplex, während intramolekular (4) das Persulfid von Cystein 41 auf Cystein 66 oder 128 transferiert wird. Alternativ erlaubt möglicherweise die veränderte SufU-Cys41-SH Konformation den direkten Sulfidtransfer auf Cystein 128 oder 66 im nächsten Zyklus. Abschließend kann der Sulfidtransferzyklus nach der Dissotiation des Komplexes (5) erneut beginnen.

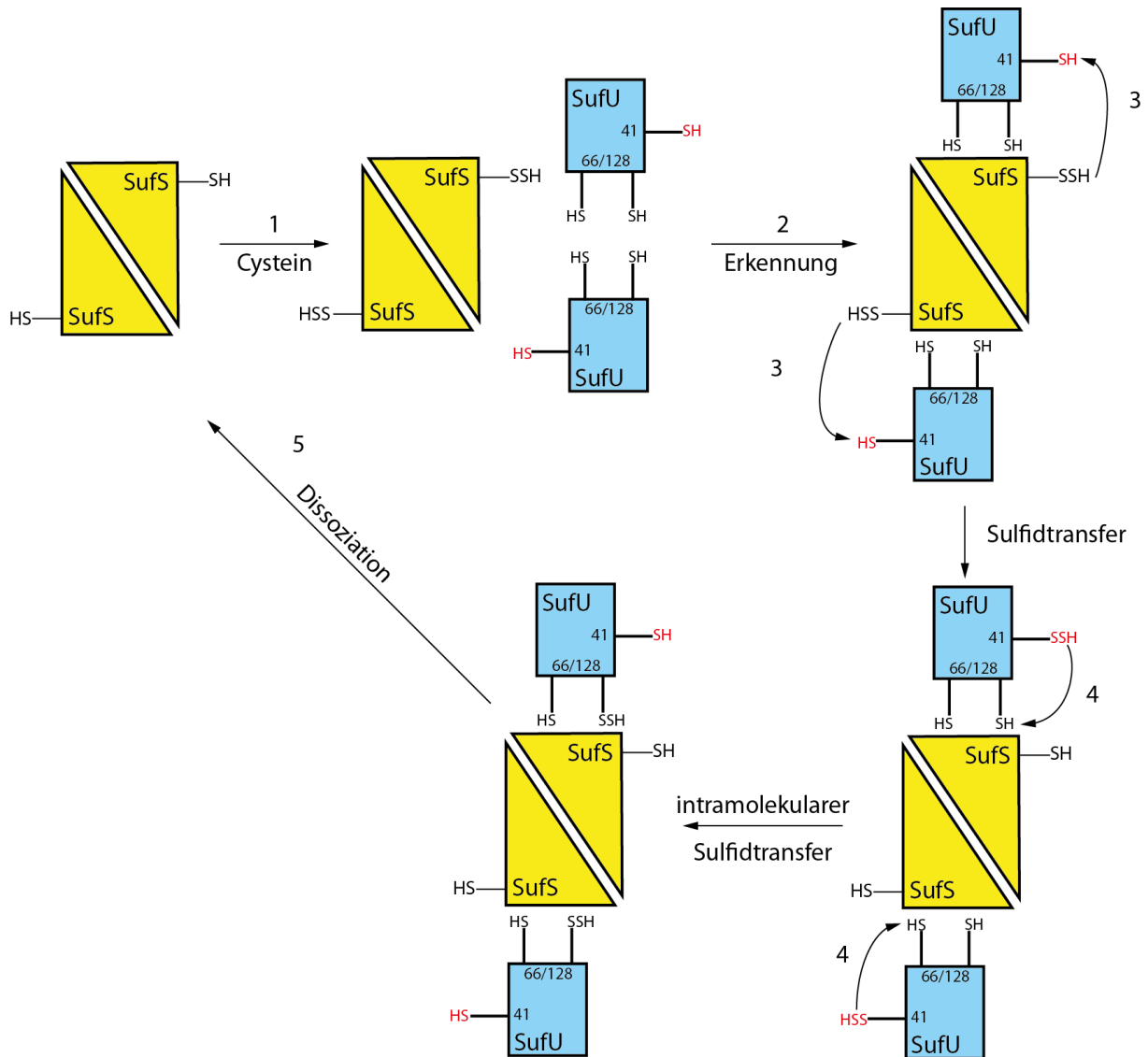


Abbildung 5.8 Potenzieller Mechanismus des Sulfidtransfers von SufS auf SufU.

Dieser Transfermechanismus wird durch die kinetische Untersuchung gestützt, die einen geordneten nicht-sequentiellen bi-bi Reaktionsmechanismus ergab. Dies stützt die These, dass nach jedem einzelnen Sulfidtransfer der Zyklus neu durchlaufen werden muss, bis alle Cysteine mit Persulfid beladen sind. Das Persulfid auf SufS scheint effizient von der Umgebung abgeschirmt zu sein, da größere Mengen DTT die Sulfidproduktion nicht signifikant erhöhen. IscS oder NifS hingegen können durch IscU und NifU nicht so stark aktiviert werden, da sie bereits eine deutlich höhere Basalaktivität besitzen und daher auch genutzt werden können, um nicht Scaffold-Proteine mit Eisen-Schwefel-Clustern zu beladen [28, 31, 35, 52, 146].

5.2.3 Das Frataxinhomologe YdhG

5.2.3.1 In vivo Charakterisierung von YdhG

Während SufU als hochkonserviertes Scaffold-Protein identifiziert werden konnte, zeigt YdhG lediglich eine Strukturhomologie zu humanem Frataxin, so dass die Frage nach seiner biologischen Funktion vollständig offen ist. Während Qi und Cowan zeigten, dass YdhG in der Lage ist, Eisen zu binden und auf IscU aus *Thermotoga* zu transferieren [122] und so Hinweise auf die Funktion als Frataxin-Homolog lieferten, so standen *in vivo* Untersuchungen noch aus.

Erste Hinweise auf eine *in vivo* Funktion in der Eisenhomöostase lieferte die native gelfreie 2D-Proteomanalyse, in welcher YdhG identifiziert wurde und als potentiell eisenbindendes Protein charakterisiert wurde. Die bestimmte Stöchiometrie Protein:Eisen war in etwa 1:2, was mit Cowans und den weiteren *in vitro* Bestimmungen dieser Arbeit übereinstimmt. Hieraus lassen sich jedoch keine Rückschlüsse auf die spezifische Funktion des Proteins ziehen.

Deutlichere Hinweise auf die Integration in die Eisenhomöostase ergab die Deletionsmutante. Auch wenn im Gegensatz zu SufU die direkte Deletion nicht letal war, so zeigte die Mutante einen drastischen Phänotyp, welcher darauf hindeutet, dass das Protein eine wichtige Funktion in der Zelle ausübt. Wie bei SufU ist die Deletion in Minimalmedium letal und auch in Vollmedium ist das Wachstum drastisch beeinträchtigt. Daraus lässt sich zunächst jedoch kein Schluss auf die physiologische Funktion ziehen.

Hinweise auf eine Funktion in der Eisenhomöostase ergaben weitere Experimente mit der Mutante. Ein erster Hinweis war der CAS-positive Phänotyp, der zum Beispiel bei der ΔsufU Mutante im ATCC 21332 nicht auftaucht. Eine Erklärung für den CAS-positiven Phänotyp konnte bisher nicht gefunden werden, da aus dem Kulturüberstand kein Bacillibactin extrahiert werden konnte.

Auch die intrazelluläre Eisenkonzentration unterschied sich nicht wesentlich vom Wildtyp. Dies wurde auch für *E. coli* und *Samonella enterica* gefunden [109, 110]. Es scheint ein allgemeines Phänomen zu sein, dass die Eisenaufnahme durch das Fehlen eines Frataxinhomologen weniger gestört wird und diese in Bakterien eher für den intrazellulären Transport verantwortlich sind.

Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass die Aktivität der Aconitase im Vergleich zum Wildtyp im Zellextrakt der $\Delta ydhG$ Mutante drastisch reduziert ist, sogar deutlich stärker als bei der $\Delta sufU$ Mutante. Auch die EPR-Spin-trapping Experimente zeigen, dass in diesen Zellen die Produktion von Radikalen, vermutlich primär durch die Atmungskette, deutlich vermindert ist. Ob eine verringerte Expression oder schlechtere Beladung der Proteine dafür verantwortlich ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht gesagt werden. Es wird spekuliert, dass in *E. coli* die verringerte Aktivität des Komplex I der Atmungskette auf eine niedrigere Expression zurückzuführen ist [111], während die Proteine jedoch allesamt vollständig beladen werden.

Ein weiterer Aspekt der $\Delta ydhG$ Mutante ist, dass sie im Gegensatz zum Wildtyp und $\Delta sufU$ kein Bacillibactin produziert, obwohl die Mutante im Bacillibactin-Produktionsstamm ATCC 21332 generiert wurde. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Eisenaufnahmesysteme noch normal arbeiten und Eisen importiert wird. Das Eisen liegt jedoch als freies Eisen in der Zelle vor, da es von keinem Transportprotein aufgenommen wird. Das freie Eisen wird durch Fur gebunden, was dann die weitere Eisenaufnahme beeinträchtigt und die Bacillibactinproduktion unterdrückt.

Es ist allerdings auch möglich, dass YdhG neben Fur in der Regulation der Bacillibactin Produktion involviert ist und durch sein Fehlen die Produktion auch unter Eisenmangelbedingungen, nicht erfolgt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Bacillibactinbiosynthese selbst abhängig von Eisen- bzw. Fe/S-Enzymen ist. Diese Fragen könnten nur durch Transkriptomstudien oder deep-sequencing Experimente geklärt werden, um zu sehen, ob die Bacillibactinproduktion bereits auf Transkriptionsebene unterdrückt wird.

Auch interessant ist, dass die Mutante in Minimalmedium, bevor sie abstirbt, ebenfalls kein Bacillibactin produziert, was auch darauf hindeutet, dass die Umstellung des Stoffwechsels gestört ist, die Eisenaufnahme jedoch nicht oder nur eingeschränkt beeinflusst ist.

5.2.3.2 In vitro Analyse von YdhG und die Interaktion mit SufU

In vitro zeigt sich, dass YdhG in der Lage ist, Eisen zu binden. Nach der Reinigung liegt YdhG eisenfrei vor, was möglicherweise an der heterologen Expression in *E. coli* lag, dessen Eisenaufnahmesystem nicht kompatibel sein könnte. Als Alternative ist die Überexpression und die geringe Menge an verfügbarem freiem Eisen eine mögliche Erklärung. Aber auch CyaY in *E. coli* ist direkt nach der Reinigung eisenfrei, was eher für die geringe verfügbare Menge an freiem Eisen spricht [150].

Mit verschiedenen Eisensalzen konnte eine Bindung von bis zu drei Fe pro Proteinmonomer erreicht werden. Für die meisten Frataxin-Homologen wurde bisher über eine Bindung von bis zu 2 Fe pro Monomer als physiologisch relevant gesprochen [61, 107, 108, 117], was in der Mehrzahl der Fälle gefunden wurde. Im Falle von FeCl_2 wird möglicherweise ein drittes Eisenion durch den His-Tag gebunden, da dieser Metall-komplexierend ist und daher ein Eisenion binden könnte. Der Redoxzustand des Eisens spielt für die Eisenbindung von YdhG hingegen keine Rolle, es wurden sowohl Eisen(II) als auch Eisen(III) gebunden. Dass der Redoxzustand keine Rolle spielt, sich aber entscheidend auf die Multimerität auswirkt, ist auch für CyaY bekannt. So konnte gezeigt werden, dass CyaY aus *E. coli* mit Eisen(II) bevorzugt Monomere bildet, mit einem Eisengehalt von etwa 2.5 Eisen pro Monomer, während Fe(III) zur Ausbildung größerer Oligomere führt, die bis zu 8 Fe pro Polypeptidkette binden [150]. Generell wurde festgestellt, dass CyaY eine stärkere Affinität zu Fe(III) als Fe(II) besitzt.

Interessant ist, dass auch die Art des Eisen-Salzes scheinbar nur geringen Einfluss besitzt. So konnte YdhG mit allen getesteten Substraten beladen werden. Besonders interessant ist dabei $\text{Fe}(\text{DHB})_3$, was ein Analogon zum Bacillibactin Hydrolyseprodukt darstellt und daher auch darauf hindeutet, dass YdhG auch mit Eisen aus dem Hydrolyseprodukt beladen werden könnte, so dass YdhG auch unter Eisenmangelbedingungen funktional ist. Es besteht trotz dieses Befundes die Möglichkeit, dass unter entsprechenden Bedingungen weitere ähnliche Systeme oder Proteine existieren, die bisher noch nicht gefunden wurden.

Es konnte neben der Eisenbindung auch gezeigt werden, dass YdhG in der Lage ist, das Eisen auf SufU zu transferieren und in Kooperation mit SufS einen Eisen-Schwefel-Cluster zu rekonstituieren. Dabei zeigte sich in einem Zeitabhängigen UV/Vis-Spektrum der Aufbau eines $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters. Auch hier ist wieder ein Unterschied zu *E. coli* IscU zu erkennen, wo

mit CyaY zunächst ein [2Fe-2S]-Cluster aufgebaut wurde [150]. In beiden Fällen zeigte sich, dass die benötigte Zeit zur Rekonstitution deutlich größer war als die chemische Rekonstitution [121].

In *E. coli* ist die länger benötigte Zeit möglicherweise darauf zurückzuführen, dass CyaY nicht als Eisen-Donor fungiert, sondern als Inhibitor der Cysteindesulfurase [119-121]. Während zwar Eisenbindung nachgewiesen werden konnte [61, 117, 150], so wurde auch gezeigt, dass insbesondere die A-Typ-Scaffolds eher als Eisendonoren für Scaffoldproteine dienen [63-65]. Dies steht im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, in denen gefunden wurde, dass Frataxin als mitochondrialer Eisentransporter dient [76, 103, 165].

Dies deutet auf eine interessante phylogenetische Trennung hin, da *Bacillus subtilis* kein essentielles A-Typ Scaffold besitzt. Dadurch wird die Aufgabe des intrazellulären Eisentransportes in *Bacillus subtilis* möglicherweise primär durch das strukturhomologe YdhG ausgeführt. YdhG ist daher möglicherweise näher mit eukaryotischem Frataxin verwandt als das Sequenzhomologe aus *E. coli* und seinen Verwandten.

Um die *in vitro* Untersuchungen abzuschließen, wurde die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese *in vitro* nachgestellt, indem auf SufU mit SufS und eisenbeladenem YdhG ein Eisen-Schwefel-Cluster rekonstituiert wurde und dieser an ein Zielprotein übertragen wurde. Als Zielprotein wurde *apo*-Aconitase verwendet und es zeigte sich, dass die Aktivität der Aconitase durch den aufgebauten Eisen-Schwefel-Cluster wiederhergestellt werden konnte (Abb. 5.9). Diese Aktivität wurde dabei schneller wiederhergestellt als durch chemische Rekonstitution oder durch Eisen, was in YdhG gebunden war.

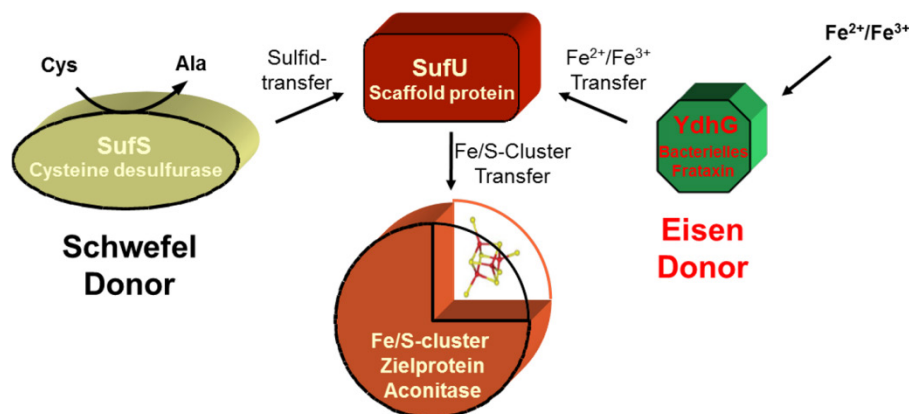


Abbildung 5.9 In vitro nachgestellte Beladung von Aconitase durch SufS, SufU und YdhG.

Interessant dabei ist, dass die Wiederherstellung der Aktivität auch mit Eisen stattfinden konnte, das an YdhG gebunden war. Dies bedeutet, dass auch YdhG, wie seine Strukturhomologen, Eisen nur schwach bindet.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass YdhG die intrazelluläre Eisendistribution übernimmt, und daher in seiner Funktion mit den Frataxinen der höheren Eukaryoten assoziiert werden kann, weshalb das Protein in Fra (Frataxin) umbenannt wurde.

5.3 Die Eisenhomöostase von *Bacillus subtilis*

In dieser Arbeit konnten die essentiellen Kernkomponenten der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese charakterisiert werden und ein Modell für die Biosynthese erstellt werden. Dadurch konnte die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese und insbesondere das Frataxinhomologe Fra in den größeren Kontext der Eisenhomöostase von *Bacillus subtilis* eingefügt werden.

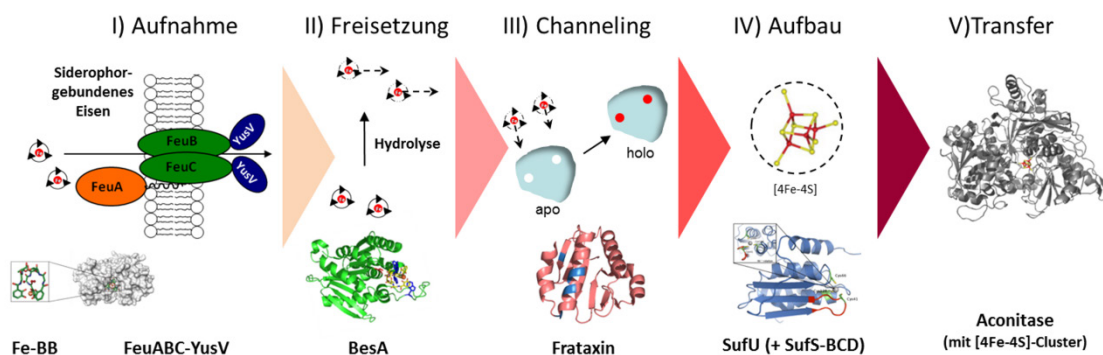


Abbildung 5.10 Ausschnitt der Eisenhomöostase von *B. subtilis* im Überblick.

Abb. 5.10 zeigt einen Ausschnitt der Eisenhomöostase von *Bacillus subtilis*, die mit der Eisenaufnahme beginnt (I). Diese kann entweder durch spezielle Ionenkanäle erfolgen oder insbesondere unter Eisenmangelbedingungen durch Siderophore, im Falle von *Bacillus subtilis* durch Bacillibactin [4, 166-169]. Die Aufnahme des beladenen Siderophors verläuft dabei durch spezifische Aufnahmesysteme, die aus Transportproteinen und Bindungsproteinen bestehen. Die Bindungsproteine haben eine hohe Affinität zum jeweiligen Siderophor oder dessen Analoga [170, 171]. Dabei kann *Bacillus subtilis* nicht nur Bacillibactin aufnehmen, sondern besitzt auch Aufnahmesysteme für exogene Siderophore wie Petrobactin [154, 172].

Nach der Aufnahme der Siderophore muss das Eisen aus diesen freigesetzt werden (II), was in *Bacillus subtilis* durch die Bacillibactinesterase BesA geschieht [4]. Auch das homologe Siderophor Enterobactin wird von BesA hydrolysiert. Möglicherweise existieren auch in *Bacillus subtilis* noch weitere Proteine, die das Eisen freisetzen, z.B. durch Reduktion. Auf welche Weise Petrobactin gebundenes Eisen freigesetzt wird ist noch unklar, jedoch könnte reduktive Freisetzung eine Rolle spielen.

Nachdem das Eisen freigesetzt oder direkt importiert wurde, kommt nun das Frataxinhomologe Fra ins Spiel (III). Freies Eisen würde durch seine gute Redoxaktivität ROS erzeugen und so die Zellen schädigen, so dass es direkt gebunden werden muss. Fra bindet das freie Eisen und transportiert es innerhalb der Zelle zu den potentiellen Zielen. Neben der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesemaschinerie kann das Eisen zur Lagerung auch zu den Ferritin-Homologen Dps und MrgA transportiert werden. Als Alternative kommt ein direkter Einbau in Eisen-bindende Proteine in Betracht oder der Transfer zu Ferrochelatase, um Häm-Proteine aufzubauen [173-175].

Neben der Ferrochelatase ist die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese anschließend der wichtigste Biosyntheseweg um Eisen-haltige Cofaktoren aufzubauen (IV). Die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese jedoch ist sehr störungsanfällig und kann durch andere Metalle wie Kupfer oder Cobalt beeinträchtigt werden [176, 177]. Abschließend werden auch Eisen-Schwefel-Cluster auf Zielproteine transferiert, so dass dieser spezifische Abschnitt der Eisenhomöostase seinen Abschluss findet (V).

Generell ist die Eisenhomöostase von anderen Metallen beeinträchtigt, die sowohl die Aufnahme und deren Regulation beeinträchtigen als auch durch den direkten Einfluss auf die Cofaktoren [177-179]. Die gesamte Metallhomöostase in den Bakterien ist daher stark reguliert und von vielen Faktoren abhängig.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die essentiellen Kernkomponenten der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese in *Bacillus subtilis* untersucht: das Scaffoldprotein SufU, die Cysteindesulfurase SufS und der potentielle Eisendonator Fra. Dabei wurden die Auswirkungen der Deletion von SufU und Fra auf *Bacillus subtilis* charakterisiert und die Proteine *in vitro* auf ihre potentielle Funktion untersucht. Daraus konnten Hinweise auf ihre Funktion innerhalb der bakteriellen Eisenhomöostase innerhalb der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese gewonnen werden.

Dennoch ergibt sich hieraus ein relativ isoliertes Bild der einzelnen Proteine. Um dieses Bild zu verfeinern ist es notwendig, die Proteine und den Proteomgesamtkontext genauer zu untersuchen.

Eine erste Frage, die sich stellt, ist die Spezifität der Biosyntheseenzyme. Ist SufU in der Lage mit allen Fe/S-Enzymen zu interagieren und diese zu beladen oder existiert ein weiteres System (SufB?), welches Teile der Fe/S-Proteine belädt? Ist Fra in der Lage, auch andere Proteine als SufU mit Eisen zu beliefern? Welchen Einfluss hat Fra auf die Aktivität der Cysteindesulfurase? Diese und weitere Fragen müssen noch untersucht werden, um die Proteine besser in den Kontext der Eisenhomöostase einzubinden.

Hierfür bieten sich viele Methoden an: Um SufU besser in den Kontext zu integrieren muss untersucht werden, mit welchen Proteinen es innerhalb der Zelle interagiert. Hierfür bieten sich z.B. die Verwendung eines *E. coli*-2-hybrid-Systems an [180], indem SufU als Köderprotein verwendet wird und die Beuteproteine aus Genomverdauen des *B. subtilis* Genoms gewonnen werden.

Alternativ zum 2-hybrid System können die Interaktionspartner möglicherweise auch direkt durch cross-linking identifiziert werden. Hierfür bietet sich die SPINE-Methode an [181]. Dabei werden die Zielproteine mit einem Strep-tag direkt in *Bacillus subtilis* exprimiert und während des Zellwachstums durch Zugabe von Formaldehyd in das Medium mit ihren Interaktionspartnern verbunden. Nach der Reinigung können die Interaktionspartner durch ihren Peptidmassenfingerprint identifiziert werden.

Diese Untersuchungen können auch für die anderen Komponenten der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthesemaschinerie verwendet werden, um so das Interaktionsnetzwerk der Biosynthese zu identifizieren und verstehen zu können.

Auch für Fra sollten entsprechende SPINE und/oder 2-Hybrid Untersuchungen durchgeführt werden um zu analysieren inwieweit Fra in den Stoffwechsel von *Bacillus subtilis* involviert ist und welche Interaktionspartner es besitzt.

Um die Unterschiede zwischen Fra und SufU besser charakterisieren zu können, sollten weitere potentielle Zielproteine in *Bacillus subtilis* identifiziert werden und durch *in vivo* Untersuchungen charakterisiert werden, um festzustellen, ob der Fra-Phänotyp durch einen

allgemeinen Fe-Mangel/Stress Phänotyp oder durch das Fehlen der Fe/S-Cluster Biosynthese ausgelöst wird.

Darüber hinaus sollten von der Fra Deletionsmutante Transkriptionsstudien oder deep-sequencing-Untersuchungen durchgeführt werden um herauszufinden, wie das Fehlen von Fra den Stoffwechsel von *Bacillus subtilis* auf der Transkriptionsebene beeinflusst. Diese Daten sollten mit anderen Transkriptionsstudien wie dem Fehlen von Fur oder auch dem Transkriptom unter oxidativem Stress verglichen werden.

Es wäre darüber hinaus auch interessant, die Transkriptomdaten der Fra-Deletionsmutante mit den Daten der SufU-Deletionsmutante zu vergleichen, um unterscheiden zu können, welchen welchen Einfluss das Fehlen von Fra im Vergleich zum Fehlen von SufU auf den Stoffwechsel besitzt. Der Einfluss von Fra scheint größer zu sein, möglicherweise wirkt sich das Fehlen von Fra jedoch an anderen Stellen stärker aus.

Schlussendlich muss auch der Einfluss von Fra auf die Kinetiken der Cysteindesulfurase untersucht werden, um zu testen ob Fra die Formation von Eisen-Schwefel-Clustern unter diesen Bedingungen begünstigt oder wie in *E. coli* möglicherweise inhibiert.

6 Literatur

1. Holleman, A.F. and N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. 102., stark umgearb. und verb. Aufl. / von Nils Wiberg. ed2007, Berlin {[u.a.]: de Gruyter. XXXIX, 2149 S.
2. Andrews, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones, *Bacterial iron homeostasis*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(2-3): p. 215-37.
3. Carrano, C.J. and K.N. Raymond, *Coordination chemistry of microbial iron transport compounds: rhodotorulic acid and iron uptake in Rhodotorula pilimanae*. J Bacteriol, 1978. **136**(1): p. 69-74.
4. Miethke, M., et al., *Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2006. **61**(6): p. 1413-27.
5. Beinert, H., *Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises*. J Biol Inorg Chem, 2000. **5**(1): p. 2-15.
6. Beinert, H., R.H. Holm, and E. Munck, *Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures*. Science, 1997. **277**(5326): p. 653-9.
7. Fontecave, M., *Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(4): p. 171-4.
8. Ohnishi, T., et al., *Studies on iron-sulfur proteins in the site I region of the respiratory chain in pigeon heart mitochondria and submitochondrial particles*. Biochem Biophys Res Commun, 1972. **46**(4): p. 1631-8.
9. Antonkine, M.L., et al., *Chemical rescue of a site-modified ligand to a [4Fe-4S] cluster in PsaC, a bacterial-like dicluster ferredoxin bound to photosystem I*. Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics, 2007. **1767**(6): p. 712-724.
10. Bothe, H., et al., *Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2010. **74**(4): p. 529-51.
11. Volbeda, A., et al., *Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from Desulfovibrio gigas*. Nature, 1995. **373**(6515): p. 580-7.
12. Lenaz, G., et al., *Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(9-10): p. 1406-20.
13. Beinert, H., M.C. Kennedy, and C.D. Stout, *Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein*. Chem Rev, 1996. **96**(7): p. 2335-2374.
14. Nesbit, A.D., et al., *Sequence-specific binding to a subset of IscR-regulated promoters does not require IscR Fe-S cluster ligation*. J Mol Biol, 2009. **387**(1): p. 28-41.
15. Schwartz, C.J., et al., *IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of Escherichia coli genes encoding Fe-S cluster assembly proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 14895-900.
16. Yeo, W.S., et al., *IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins*. Mol Microbiol, 2006. **61**(1): p. 206-18.
17. Seefeldt, L.C., B.M. Hoffman, and D.R. Dean, *Mechanism of Mo-dependent nitrogenase*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 701-22.
18. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*. 5. Aufl.. ed2003, Heidelberg {[u.a.]: Spektrum, Akad. Verl. XXXV, 1153 S.
19. Hunsicker-Wang, L.M., et al., *High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from Thermus thermophilus: analysis and comparison*. Biochemistry, 2003. **42**(24): p. 7303-17.
20. Cunningham, R.P., et al., *Endonuclease III is an iron-sulfur protein*. Biochemistry, 1989. **28**(10): p. 4450-5.
21. Demple, B., H. Ding, and M. Jorgensen, *Escherichia coli SoxR protein: sensor/transducer of oxidative stress and nitric oxide*. Methods Enzymol, 2002. **348**: p. 355-64.

22. Dai, S., et al., *Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster*. Science, 2000. **287**(5453): p. 655-8.
23. Jameson, G.N., et al., *Role of the [2Fe-2S] cluster in recombinant Escherichia coli biotin synthase*. Biochemistry, 2004. **43**(7): p. 2022-31.
24. Lotierzoa, M., et al., *Iron-sulfur cluster dynamics in biotin synthase: A new [2Fe-2S]I+ cluster*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **381**(4): p. 487-490.
25. He, W.Z. and R. Malkin, *Reconstitution of Iron-Sulfur Center-B of Photosystem-I Damaged by Mercuric-Chloride*. Photosynthesis Research, 1994. **41**(3): p. 381-388.
26. Dos Santos, P.C., et al., *Iron-sulfur cluster assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19705-11.
27. Jacobson, M.R., et al., *Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from Azotobacter vinelandii*. Mol Gen Genet, 1989. **219**(1-2): p. 49-57.
28. Mihara, H., et al., *Cysteine sulfinatase desulfinase, a NIFS-like protein of Escherichia coli with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22417-24.
29. Zheng, L., et al., *Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from Azotobacter vinelandii*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13264-72.
30. Takahashi, Y. and U. Tokumoto, *A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(32): p. 28380-28383.
31. Zheng, L., et al., *Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2754-8.
32. Zheng, L., et al., *Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product*. Biochemistry, 1994. **33**(15): p. 4714-20.
33. Hidese, R., H. Mihara, and N. Esaki, *Bacterial cysteine desulfurases: versatile key players in biosynthetic pathways of sulfur-containing biofactors*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **91**(1): p. 47-61.
34. Mihara, H. and N. Esaki, *Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **60**(1-2): p. 12-23.
35. Mihara, H., et al., *Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from Escherichia coli: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions*. J Biochem, 2000. **127**(4): p. 559-67.
36. Kambampati, R. and C.T. Lauhon, *Evidence for the transfer of sulfane sulfur from IscS to ThiI during the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in Escherichia coli tRNA*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10727-30.
37. Lauhon, C.T. and R. Kambampati, *The iscS gene in Escherichia coli is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 20096-103.
38. Zhang, W., et al., *IscS functions as a primary sulfur-donating enzyme by interacting specifically with MoeB and MoaD in the biosynthesis of molybdopterin in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2302-8.
39. Smith, A.D., et al., *NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein*. Biochemistry, 2005. **44**(39): p. 12955-69.
40. Agar, J.N., et al., *IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU*. Biochemistry, 2000. **39**(27): p. 7856-62.

41. Tan, G., et al., *IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in Escherichia coli under aerobic growth conditions*. Biochem J, 2009. **420**(3): p. 463-72.
42. Yang, J., J.P. Bitoun, and H. Ding, *Interplay of IscA and IscU in Biogenesis of Iron-Sulfur Clusters*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(38): p. 27956-27963.
43. Layer, G., et al., *SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13342-50.
44. Sun, D. and P. Setlow, *Cloning, nucleotide sequence, and regulation of the Bacillus subtilis nadB gene and a nifS-like gene, both of which are essential for NAD biosynthesis*. J Bacteriol, 1993. **175**(5): p. 1423-32.
45. Py, B., P.L. Moreau, and F. Barras, *Fe-S clusters, fragile sentinels of the cell*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(2): p. 218-23.
46. Dos Santos, P.C., et al., *Controlled expression of nif and isc iron-sulfur protein maturation components reveals target specificity and limited functional replacement between the two systems*. J Bacteriol, 2007. **189**(7): p. 2854-62.
47. Smith, A.D., et al., *Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU*. FEBS Lett, 2005. **579**(23): p. 5236-40.
48. Kato, S., et al., *Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 5948-52.
49. Kurihara, T., et al., *Assembly of iron-sulfur clusters mediated by cysteine desulfurases, IscS, CsdB and CSD, from Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1647**(1-2): p. 303-9.
50. Shi, R., et al., *Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions*. PLoS Biol, 2010. **8**(4): p. e1000354.
51. Foster, M.W., et al., *A Mutant Human IscU Protein Contains a Stable [2Fe-2S]₂⁺ Center of Possible Functional Significance*. J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**(28): p. 6805-6806.
52. Schwartz, C.J., et al., *The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9009-14.
53. Bertini, I., et al., *Thermotoga maritima IscU. Structural characterization and dynamics of a new class of metallochaperone*. J Mol Biol, 2003. **331**(4): p. 907-24.
54. Mansy, S.S., S.P. Wu, and J.A. Cowan, *Iron-sulfur cluster biosynthesis: biochemical characterization of the conformational dynamics of Thermotoga maritima IscU and the relevance for cellular cluster assembly*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10469-75.
55. Ramelot, T.A., et al., *Solution NMR structure of the iron-sulfur cluster assembly protein U (IscU) with zinc bound at the active site*. J Mol Biol, 2004. **344**(2): p. 567-83.
56. Chandramouli, K., et al., *Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein*. Biochemistry, 2007. **46**(23): p. 6804-11.
57. Shimomura, Y., et al., *The Asymmetric Trimeric Architecture of [2Fe-2S] IscU: Implications for Its Scaffolding during Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis*. Journal of Molecular Biology, 2008. **383**(1): p. 133-143.
58. Unciuleac, M.C., et al., *In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein*. Biochemistry, 2007. **46**(23): p. 6812-21.
59. Wu, S.P., et al., *Iron-sulfur cluster biosynthesis. Kinetic analysis of [2Fe-2S] cluster transfer from holo ISU to apo Fd: role of redox chemistry and a conserved aspartate*. Biochemistry, 2002. **41**(28): p. 8876-85.

60. Bonomi, F., et al., *Studies on the Mechanism of Catalysis of Iron–Sulfur Cluster Transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB Chaperones*. Biochemistry, 2008. **47**(48): p. 12795–12801.
61. Ding, H., et al., *Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 7997–8004.
62. Lu, J., et al., *Complementary roles of SufA and IscA in the biogenesis of iron-sulfur clusters in Escherichia coli*. Biochem J, 2008. **409**(2): p. 535–43.
63. Loiseau, L., et al., *ErpA, an iron sulfur (Fe S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13626–31.
64. Vinella, D., et al., *Iron-sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomic and genetic studies of A-type carriers*. PLoS Genet, 2009. **5**(5): p. e1000497.
65. Wang, W., et al., *In vivo evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in Escherichia coli*. Biochem J, 2010. **432**(3): p. 429–36.
66. Johnson, D.C., et al., *Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 247–81.
67. Ollagnier-de-Choudens, S., Y. Sanakis, and M. Fontecave, *SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly*. J Biol Inorg Chem, 2004. **9**(7): p. 828–38.
68. Cupp-Vickery, J.R., et al., *Crystal Structure of the Molecular Chaperone HscA Substrate Binding Domain Complexed with the IscU Recognition Peptide ELPPVKIHC*. Journal of Molecular Biology, 2004. **342**(4): p. 1265–1278.
69. Hoff, K.G., J.R. Cupp-Vickery, and L.E. Vickery, *Contributions of the LPPVK Motif of the Iron-Sulfur Template Protein IscU to Interactions with the Hsc66-Hsc20 Chaperone System*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(39): p. 37582–37589.
70. Hoff, K.G., et al., *Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the iron-sulfur cluster template protein IscU*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27353–9.
71. Kim, J.H., et al., *Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB*. Biochemistry, 2009. **48**(26): p. 6062–71.
72. Tapley, T.L. and L.E. Vickery, *Preferential Substrate Binding Orientation by the Molecular Chaperone HscA*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(27): p. 28435–28442.
73. Chandramouli, K. and M.K. Johnson, *HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction*. Biochemistry, 2006. **45**(37): p. 11087–95.
74. Tokumoto, U. and Y. Takahashi, *Genetic Analysis of the isc Operon in Escherichia coli Involved in the Biogenesis of Cellular Iron-Sulfur Proteins*. The Journal of biochemistry, 2001. **130**(1): p. 63–71.
75. Lill, R. and U. Muhlenhoff, *Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 669–700.
76. Ye, H. and T.A. Rouault, *Human Iron-Sulfur Cluster Assembly, Cellular Iron Homeostasis, and Disease*. Biochemistry, 2010.
77. Lee, J.H., W.S. Yeo, and J.H. Roe, *Induction of the sufA operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor*. Mol Microbiol, 2004. **51**(6): p. 1745–55.

-
78. Jang, S. and J.A. Imlay, *Hydrogen peroxide inactivates the Escherichia coli Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate*. Mol Microbiol, 2010. **78**(6): p. 1448-67.
79. Fontecave, M., et al., *Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery*. J Biol Inorg Chem, 2005. **10**(7): p. 713-21.
80. Loiseau, L., et al., *Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38352-9.
81. Eccleston, J.F., et al., *The kinetic mechanism of the SufC ATPase: the cleavage step is accelerated by SufB*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8371-8.
82. Kitaoka, S., et al., *Crystal structure of Escherichia coli SufC, an ABC-type ATPase component of the SUF iron-sulfur cluster assembly machinery*. FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 137-43.
83. Petrovic, A., et al., *Hydrodynamic characterization of the SufBC and SufCD complexes and their interaction with fluorescent adenosine nucleotides*. Protein Science, 2008. **17**(7): p. 1264 - 1274.
84. Wada, K., et al., *Molecular dynamism of Fe-S cluster biosynthesis implicated by the structure of the SufC(2)-SufD(2) complex*. J Mol Biol, 2009. **387**(1): p. 245-58.
85. Saini, A., et al., *SufD and SufC ATPase activity are required for iron acquisition during in vivo Fe-S cluster formation on SufB*. Biochemistry, 2010. **49**(43): p. 9402-12.
86. Outten, F.W., et al., *The SufE Protein and the SufBCD Complex Enhance SufS Cysteine Desulfurase Activity as Part of a Sulfur Transfer Pathway for Fe-S Cluster Assembly in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **78**(46): p. 45713-45719.
87. Wollers, S., et al., *Iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly: the SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor*. J Biol Chem, 2010.
88. Gupta, V., et al., *Native Escherichia coli SufA, coexpressed with SufBCDSE, purifies as a [2Fe-2S] protein and acts as an Fe-S transporter to Fe-S target enzymes*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(17): p. 6149-53.
89. Sendra, M., et al., *The SUF iron-sulfur cluster biosynthetic machinery: sulfur transfer from the SUFS-SUFE complex to SUFA*. FEBS Lett, 2007. **581**(7): p. 1362-8.
90. Chahal, H.K., et al., *The SufBCD Fe-S scaffold complex interacts with SufA for Fe-S cluster transfer*. Biochemistry, 2009. **48**(44): p. 10644-53.
91. Barras, F., L. Loiseau, and B. Py, *How Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae build Fe/S proteins*. Adv Microb Physiol, 2005. **50**: p. 41-101.
92. Ayala-Castro, C., A. Saini, and F.W. Outten, *Fe-S Cluster Assembly Pathways in Bacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008. **72**(1): p. 110-125.
93. Partridge, J.D., et al., *NsrR targets in the Escherichia coli genome: new insights into DNA sequence requirements for binding and a role for NsrR in the regulation of motility*. Mol Microbiol, 2009. **73**(4): p. 680-94.
94. Tokumoto, U., et al., *Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the isc and suf operons in Escherichia coli with the nifSU-like operon from Helicobacter pylori*. J Biochem, 2004. **136**(2): p. 199-209.
95. Lill, R., *Function and biogenesis of iron-sulphur proteins*. Nature, 2009. **460**: p. 831-838.
96. Stemmler, T.L., et al., *Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(35): p. 26737-43.
97. Rotig, A., et al., *Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 215-7.
-

98. Gibson, T.J., et al., *Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction*. Trends Neurosci, 1996. **19**(11): p. 465-8.
99. Babcock, M., et al., *Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin*. Science, 1997. **276**(5319): p. 1709-12.
100. Calmels, N., et al., *The first cellular models based on frataxin missense mutations that reproduce spontaneously the defects associated with Friedreich ataxia*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6379.
101. Mühlenhoff, U., et al., *A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40612-20.
102. Zhang, Y., et al., *Mrs3p, Mrs4p, and frataxin provide iron for Fe-S cluster synthesis in mitochondria*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22493-502.
103. Gerber, J., U. Muhlenhoff, and R. Lill, *An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1*. EMBO Rep, 2003. **4**(9): p. 906-11.
104. Foury, F., A. Pastore, and M. Trincal, *Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe-S cluster assembly*. EMBO Rep, 2007. **8**(2): p. 194-9.
105. Gakh, O., et al., *Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly*. J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 38486-501.
106. Tsai, C.L. and D.P. Barondeau, *Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex*. Biochemistry, 2010. **49**(43): p. 9132-9.
107. Ai, C., et al., *Expression, Purification, and Characterization of an Iron Chaperon Protein CyaY from Acidithiobacillus ferrooxidans*. Curr Microbiol, 2010.
108. Bou-Abdallah, F., et al., *Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of Escherichia coli*. J Mol Biol, 2004. **341**(2): p. 605-15.
109. Li, D.S., et al., *Knock-out of the cyaY gene in Escherichia coli does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants*. FEBS Lett, 1999. **456**(1): p. 13-6.
110. Vivas, E., E. Skovran, and D.M. Downs, *Salmonella enterica strains lacking the frataxin homolog CyaY show defects in Fe-S cluster metabolism in vivo*. J Bacteriol, 2006. **188**(3): p. 1175-9.
111. Pohl, T., et al., *Effects of the deletion of the Escherichia coli frataxin homologue CyaY on the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase*. BMC Biochem, 2007. **8**: p. 13.
112. Cho, S.J., et al., *Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8932-7.
113. Dhe-Paganon, S., et al., *Crystal structure of human frataxin*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30753-6.
114. He, Y., et al., *Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferroxidase interaction*. Biochemistry, 2004. **43**(51): p. 16254-62.
115. Musco, G., et al., *Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin*. Structure, 2000. **8**(7): p. 695-707.
116. Nair, M., et al., *Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites*. Structure, 2004. **12**(11): p. 2037-48.
117. Pastore, C., et al., *Understanding the binding properties of an unusual metal-binding protein--a study of bacterial frataxin*. FEBS J, 2007. **274**(16): p. 4199-210.
118. Yoon, T. and J.A. Cowan, *Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(20): p. 6078-84.
119. Adinolfi, S., et al., *Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(4): p. 390-6.

-
120. Prischi, F., et al., *Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly*. Nat Commun, 2010. **1**: p. 95.
121. Iannuzzi, C., et al., *The Role of CyaY in Iron Sulfur Cluster Assembly on the E. coli IscU Scaffold Protein*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21992.
122. Qi, W. and J.A. Cowan, *A structural and functional homolog supports a general role for frataxin in cellular iron chemistry*. Chem Commun (Camb), 2010. **46**(5): p. 719-21.
123. Albrecht, A., *Untersuchungen zur Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern in Bacillus subtilis*, in *Fachbereich Chemie*2007, Philipps-Universität Marburg: Marburg.
124. Kim, L., A. Mogk, and W. Schumann, *A xylose-inducible Bacillus subtilis integration vector and its application*. Gene, 1996. **181**(1-2): p. 71-76.
125. Schaeffer, P., J. Millet, and J.P. Aubert, *Catabolic repression of bacterial sporulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**(3): p. 704-11.
126. Stülke, J., R. Hanschke, and M. Hecker, *Temporal activation of β -glucanase synthesis in Bacillus subtilis is mediated by the GTP pool*. Journal of general microbiology, 1993. **139**: p. 2041-2045.
127. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A laboratory manual*1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
128. Zheng, L., U. Baumann, and J.-L. Reymond, *An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(14): p. e115.
129. Landmann, H., *Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Metalloproteinen aus Bacillus subtilis*, in *Chemie/Biochemie*2011, Philipps-Universität Marburg: Marburg. p. 128.
130. Wach, A., *PCR-Synthesis of Marker Cassettes with Long Flanking Homology Regions for Gene Disruptions in S. cerevisiae*. Yeast, 1996. **12**: p. 259-265.
131. Kuwayama, H., et al., *PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(2): p. E2.
132. Schwyn, B. and J.B. Neilands, *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. Anal Biochem, 1987. **160**(1): p. 47-56.
133. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
134. Chung, M.C., *A specific iron stain for iron-binding proteins in polyacrylamide gels: application to transferrin and lactoferrin*. Anal Biochem, 1985. **148**(2): p. 498-502.
135. Siegel, L.M., *A Direct Microdetermination for Sulfide*. Analytical Biochemistry, 1965. **11**: p. 126-132.
136. Gross, S.R., R.O. Burns, and H.E. Umbarger, *The Biosynthesis of Leucine. II. The Enzymic Isomerization of β -Carboxy- β -Hydroxyisocaproate and α -Hydroxy- β -Carboxyisocaproate*. Biochemistry, 1963. **2**(5): p. 1046-1052.
137. Rose, I.A. and E.L. O'Connell, *Mechanism of Aconitase Action*. Journal of Biological Chemistry, 1967. **242**(8): p. 1870-1879.
138. Drapier, J.C. and J.B.J. Hibbs, *Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis*. Methods in Enzymology, 1996. **269**: p. 26-36.
139. Hausladen, A. and I. Fridovich, *Measuring nitric oxide and superoxide: rate constants for aconitase reactivity*. Methods in Enzymology, 1996. **269**: p. 37-41.
140. Hatefi, Y. and D. Stiggall, *Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (complex II)*. Methods in Enzymology, 1978. **53**: p. 21-27.
141. Kispal, G., et al., *The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis*. FEBS Letters, 1997. **418**(13): p. 346-350.
-

142. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
143. Kobayashia, K., *Essential Bacillus subtilis genes*. PNAS, 2003. **100**(8): p. 4678-4683.
144. Netz, D.J.A., et al., *The CfdI–Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol*. Nature Chemical Biology, 2007. **3**: p. 278 - 286.
145. Raulfs, E.C., et al., *In vivo iron–sulfur cluster formation*. PNAS, 2008. **105**(25): p. 8591-8596.
146. Yuvaniyama, P., et al., *NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein*. PNAS, 2000. **97**(2): p. 599-604.
147. Kornhaber, G.J., et al., *Identification of zinc-ligated cysteine residues based on ¹³Calpha and ¹³Cbeta chemical shift data*. J Biomol NMR, 2006. **34**(4): p. 259-69.
148. Selbach, B., E. Earles, and P.C. Dos Santos, *Kinetic analysis of the bisubstrate cysteine desulfurase SufS from Bacillus subtilis*. Biochemistry, 2010. **49**(40): p. 8794-802.
149. Copeland, R.A., *Enzymes : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2. Aufl.. ed2000, New York {[u.a.]}: Wiley. XVII, 397 S.
150. Layer, G., et al., *Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of Escherichia coli CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16256-63.
151. Andreoletti, P., et al., *High-resolution structure and biochemical properties of a recombinant Proteus mirabilis catalase depleted in iron*. Proteins, 2003. **50**(2): p. 261-71.
152. Hakansson, K.O., M. Brugna, and L. Tasse, *The three-dimensional structure of catalase from Enterococcus faecalis*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 8): p. 1374-80.
153. Loewen, P.C., et al., *Structure of Helicobacter pylori catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 Å resolution*. Biochemistry, 2004. **43**(11): p. 3089-103.
154. Ollinger, J., et al., *Role of the Fur Regulon in Iron Transport in Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 2006. **188**(10): p. 3664.
155. Notredame, C., D.G. Higgins, and J. Heringa, *T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment*. J Mol Biol, 2000. **302**(1): p. 205-17.
156. Jang, S. and J.A. Imlay, *Micromolar Intracellular Hydrogen Peroxide Disrupts Metabolism by Damaging Iron-Sulfur Enzymes*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(2).
157. Pohl, S., et al., *Combined proteomic and transcriptomic analysis of the response of Bacillus anthracis to oxidative stress*. Proteomics, 2011. **11**(15): p. 3036-55.
158. Schroeter, R., et al., *The peroxide stress response of Bacillus licheniformis*. Proteomics, 2011. **11**(14): p. 2851-66.
159. Huet, G., M. Daffe, and I. Saves, *Identification of the Mycobacterium tuberculosis SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of [Fe-S] cluster assembly: evidence for its implication in the pathogen's survival*. J Bacteriol, 2005. **187**(17): p. 6137-46.
160. Riboldi, G.P., H. Verli, and J. Frazzon, *Structural studies of the Enterococcus faecalis SufU [Fe-S] cluster protein*. BMC Biochem, 2009. **10**: p. 3.
161. Johnson, D.C., M.C. Unciuleac, and D.R. Dean, *Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol, 2006. **188**(21): p. 7551-61.
162. Riboldi, G.P., J.S. de Oliveira, and J. Frazzon, *Enterococcus faecalis SufU scaffold protein enhances SufS desulfurase activity by acquiring sulfur from its cysteine-153*. Biochim Biophys Acta, 2011.

-
163. Liu, J., et al., *Structural characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein IscU in a zinc-bound form*. Proteins, 2005. **59**(4): p. 875-81.
164. Mulkidjanian, A.Y. and M.Y. Galperin, *On the origin of life in the zinc world. 2. Validation of the hypothesis on the photosynthesizing zinc sulfide edifices as cradles of life on Earth*. Biol Direct, 2009. **4**: p. 27.
165. Richardson, D.R., et al., *The ins and outs of mitochondrial iron-loading: the metabolic defect in Friedreich's ataxia*. J Mol Med, 2010. **88**(4): p. 323-9.
166. Moore, C.M. and J.D. Helmann, *Metal ion homeostasis in Bacillus subtilis*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(2): p. 188-95.
167. Dertz, E.A., A. Stintzi, and K.N. Raymond, *Siderophore-mediated iron transport in Bacillus subtilis and Corynebacterium glutamicum*. J Biol Inorg Chem, 2006. **11**(8): p. 1087-97.
168. Dertz, E.A., et al., *Bacillibactin-mediated iron transport in Bacillus subtilis*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(1): p. 22-3.
169. Miethke, M. and M.A. Marahiel, *Siderophore based iron Acquisition and Pathogen Control*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007. **71**(3): p. 413.
170. Peuckert, F., et al., *Structural basis and stereochemistry of triscatecholate siderophore binding by FeuA*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(42): p. 7924-7.
171. Peuckert, F., et al., *The siderophore binding protein FeuA shows limited promiscuity toward exogenous triscatecholates*. Chem Biol, 2011. **18**(7): p. 907-19.
172. Bugdahn, N., et al., *Direct identification of a siderophore import protein using synthetic petrobactin ligands*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(52): p. 10210-3.
173. Hansson, M.D., et al., *Amino acid residues His183 and Glu264 in Bacillus subtilis ferrochelatase direct and facilitate the insertion of metal ion into protoporphyrin IX*. Biochemistry, 2007. **46**(1): p. 87-94.
174. Hansson, M.D., M. Lindstam, and M. Hansson, *Crosstalk between metal ions in Bacillus subtilis ferrochelatase*. J Biol Inorg Chem, 2006. **11**(3): p. 325-33.
175. Lecerof, D., et al., *Metal binding to Bacillus subtilis ferrochelatase and interaction between metal sites*. J Biol Inorg Chem, 2003. **8**(4): p. 452-8.
176. Ranquet, C., et al., *Cobalt stress in Escherichia coli. The effect on the iron-sulfur proteins*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30442-51.
177. Chillappagari, S., et al., *Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2010. **192**(10): p. 2512-24.
178. Miethke, M., et al., *Iron starvation triggers the stringent response and induces amino acid biosynthesis for bacillibactin production in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2006. **188**(24): p. 8655-7.
179. Macomber, L. and R.P. Hausinger, *Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms*. Metallomics, 2011.
180. Karimova, G., et al., *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5752-6.
181. Herzberg, C., et al., *SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo*. Proteomics, 2007. **7**(22): p. 4032-5.
-

7 Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel für die interessante und herausfordernde Themenstellung bedanken. Seine beständige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und die gute Ausstattung des Arbeitskreises, sowie die eingeräumten Freiheiten und Gestaltungsmöglichkeiten beim Bearbeiten der Themenstellung haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Lill möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken, sowie auch für die gute Kooperation im Rahmen dieses Projektes, seine Diskussionsbereitschaft und seine guten Vorschläge zur Verbesserung dieser Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Andreas Seubert und Prof. Dr. Norbert Hampf für die Bereitschaft, in der Prüfungskommission mitzuwirken.

Mein Dank gilt weiterhin den aktiven und ehemaligen Mitgliedern der „Eisen-Gang“ der Arbeitsgruppe Marahiel, im besonderen Dr. Marcus Miethke, bei dem ich mich für die gute Zusammenarbeit und die vielen Diskussionen sowie seine Hilfestellung in allen Bereichen dieser Doktorarbeit bedanken möchte, Dr. Florian Peuckert für die gemeinsame Zeit im Labor, die gute Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Projekten, die vielen angeregten Diskussionen und seine Bereitschaft, stets neue Namen zu finden. Hannes Landmann danke ich für sein Einspringen bei Teilgebieten dieser Doktorarbeit und seinen unermüdlichen Einsatz im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen aktuellen und ehemaligen Laborkollegen Dr. Lars Robbel, Dr. Florian Peuckert, Vera Schultz, Jessica Fischer, Vanessa Siegmund, Stefanie Uhlmann, Mattia Bosello, Hannes Landmann und Kamilla Franke für die freundliche, angenehme, kollegiale und produktive Atmosphäre im Labor bedanken.

Neben meinen Kollegen im Labor möchte ich mich auch bei dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Lill bedanken für die freundliche Kooperation und die hilfreichen Diskussionen. Besonders danken möchte ich dabei PD Dr. Antonio Pierik und Dr. Daili J. Aguilier Netz, die durch ihre Hilfe, ihr Wissen und ihren Einsatz diese Doktorarbeit mit ermöglicht haben.

Bei Dr. Olaf Burghaus möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den EPR-Experimenten bedanken und für seine Hilfsbereitschaft und die technischen und physikalischen Erklärungen hinter der EPR-Spektroskopie.

Bei Prof. Dr. Andreas Seubert und David Nette bedanke ich mich zusätzlich für die Kooperation und die Durchführung und Auswertung der ICP-MS Analysen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meiner Bachelorstudentin Kathrin Hnida und meiner Vertiefungsstudentin Kamila Franke für ihre engagierten Beiträge.

Dem Massenspektrometrie-Team der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Dr. Uwe Linne danke ich für die vielen Messungen und Auswertungen und die Hilfe bei massenspektrometrischen Fragestellungen.

Für technische und organisatorische Unterstützung bei dieser Arbeit bedanke ich mich bei Antje Schäfer, Christiane Bomm, Gabriele Schimpff-Weiland, Roswitha Roller-Müller und Anke Botthoff.

Für die rasche und kritische Durchsicht dieser Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Marcus Miethke, Dr. Florian Peuckert, Tobias Gießen und Femke Kraas.

Ich danke allen Mitarbeitern und Kollegen des Arbeitskreises Marahiel für die schöne Zeit, sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors und für die vielen „philosophischen“ und „niveauvollen“ Diskussionen im Kaffeeraum.

Ich bedanke mich bei allen Freunden, die ich während meines Studiums in Marburg gefunden habe und mit denen ich eine schöne Zeit hatte. Ganz besonders möchte ich mich dabei bei Liliane Apel für die schöne gemeinsame Zeit und ihr offenes Ohr in guten wie in schlechten Zeiten bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben. Auch bei meinem Bruder möchte ich mich dafür bedanken, dass er immer für mich da war.

Wissenschaftlicher Werdegang des Verfassers

Kurzfassung des wissenschaftlichen Werdegangs des Verfassers nach § 17, Abs. 2 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 15.07.2009.

Die Seite 143 (Wissenschaftlicher Werdegang) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.